

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. C. Klein

**Tierexperimentelle Untersuchungen zu den pharmakodynamischen Effekten  
von Tetrahydrobiopterin und Natrium-Phenylbutyrat auf die *in vivo*  
Phenylalaninoxidationsrate von Mäusen mit genetisch bedingtem Defekt der  
Phenylalaninhydroxylase**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Alice Fuchs  
aus Linz  
2014



**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Ania C. Muntau
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Franz-Xaver Reichl Prof. Dr. Kai Bötzel
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. Florian Lagler
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	10.07.2014



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
Zusammenfassung.....	6
Abkürzungen .....	7
1. Einleitung.....	8
1.1. Grundlagen .....	8
1.1.1. Die Phenylketonurie .....	8
1.1.2. Tetrahydrobiopterin und die Behandlung von PAH-defizienten Patienten .....	10
1.1.3. Phenylbutyrat als Behandlungsalternative.....	12
1.1.4. Phenylbutyrat (PBA) .....	13
1.1.5. BTBR, <i>Pah<sup>enu1</sup></i> , <i>Pah<sup>enu1/2</sup></i> , <i>Pah<sup>enu2</sup></i> als Tiermodelle für die PAH-Defizienz .....	15
1.1.6. Quantifizierung der Phenylalaninoxidationsrate <i>in vivo</i> mittels L-[1- <sup>13</sup> C]-Phenylalanin Atemtest .....	15
1.2. Zielsetzung .....	18
2. Materialien und Methoden .....	19
2.1. Substanzen.....	19
2.1.1. L-[1- <sup>13</sup> C]-Phenylalanin (Tracer, <sup>13</sup> C-Phe).....	19
2.1.2. Tetrahydrobiopterin (BH <sub>4</sub> ) .....	19
2.1.3. Phenylbutyrat.....	19
2.1.4. Phenylalanin (Phe).....	19
2.1.5. NaCl .....	19
2.1.6. PBS.....	19
2.1.7. Ascorbat.....	19
2.1.8. Atemkalk.....	20
2.1.9. Chlorhämmin.....	20
2.2. Präparation der Injektionslösungen .....	20
2.2.1. L-[1- <sup>13</sup> C]-Phenylalanin (Tracer) .....	20
2.2.2. Tetrahydrobiopterin .....	20
2.2.3. Phenylalanin.....	20
2.2.4. Phenylbutyrat (PBA) .....	21

2.3. Versuchsaufbau .....	21
2.3.1. Grundprinzip .....	21
2.3.2. Optimierung des Versuchsaufbaus .....	22
2.3.3. Software „IRIS program version 2.343“ .....	23
2.3.4. Konfiguration der IRIS DOC-Soft, Infra Red Isotype Analyzer .....	25
2.3.5. Akkumulationszeit .....	25
2.3.6. Einlasszeit .....	25
2.3.7. Wartezeit .....	25
2.3.8. Messung .....	26
2.3.9. Spülzeit (IRIS) .....	27
2.3.10. Atemtestkäfige .....	29
2.3.11. Filterung des Atemgases .....	29
2.3.12. Regulation der Luftversorgung .....	30
2.3.13. Regulation der Umgebungstemperatur .....	30
2.3.14. Quantifizierung von Pterinen .....	30
2.3.15. HPLC Analyse .....	31
2.4. Allgemeiner Versuchsaufbau / Basisprotokoll .....	31
2.4.1. Haltung und Pflege der Tiere .....	31
2.4.2. Vorbereitung .....	32
2.4.2.1. Vorbereitung der Mäuse .....	32
2.4.2.2. Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des Atemkalks .....	32
2.4.3. Durchführung des Atemtestes .....	32
2.4.4. Durchführung der Blutabnahme .....	33
2.4.5. Weiterverarbeitung der Blutproben und Normalisierung auf Hämoglobin .....	33
2.4.6. Vorbereitung der Proben für die HPLC-Analyse .....	34
2.4.6.1. Pterin Kinetik .....	34
2.4.6.2. HPLC, High Performance Liquid Chromatography .....	34
2.4.6.3. IRIS, Infrared Isotype Analyzer .....	35
2.4.7. Optimierung des Untersuchungsintervalls .....	36
2.5. Statistische Auswertung .....	36
2.5.1. Regression .....	36

2.5.2.	Bestimmung der Halbwertszeiten.....	37
3.	Ergebnisse .....	38
3.1.	<i>Pah<sup>enu1</sup></i> und <i>Pah<sup>enu2</sup></i> als Modelle für die humane BH <sub>4</sub> -sensitive PKU .....	38
3.1.1.	Charakterisierung PAH-defizienter und korrespondierender Wildtypmäuse ....	38
3.1.1.1.	Phenylalaninkonzentrationen im Blut.....	38
3.1.1.2.	Phenylalaninoxidation <i>in vivo</i> .....	39
3.1.2.	Charakterisierung pharmakologischer Effekte von BH <sub>4</sub> .....	41
3.1.2.1.	Untersuchung der Regulation durch Substrat und Kofaktor im Wildtyp ....	41
3.1.2.1.1.	Untersuchung des Effektes des Kofaktors BH <sub>4</sub> auf die PAH-Aktivität im Wildtyp.....	41
3.1.2.1.2.	Untersuchung des Effektes des Substrates Phenylalanin auf die PAH-Aktivität im Wildtyp.....	42
3.1.2.2.	BH <sub>4</sub> -Effekt in PAH-defizienten Tieren.....	44
3.1.2.2.1.	ENU1 und ENU1/2 .....	44
3.1.2.2.2.	Phenylalanin- <i>Clearance</i> in ENU1 und ENU1/2 .....	46
3.1.2.3.	Pharmakokinetik von BH <sub>4</sub> im Mausmodell.....	47
3.2.	Alternative Moleküle .....	53
3.2.1.	Effekt von intraperitoneal verabreichtem Na-Phenylbutyrat auf die Phenylalaninoxidation in <i>Pah<sup>enu1</sup></i> und <i>Pah<sup>enu1/2</sup></i> .....	53
3.2.1.1.	Additiver Effekt von Na-Phenylbutyrat und BH <sub>4</sub> .....	56
3.2.1.2.	Blutphenylalaninwerte unter Kombinationstherapie .....	58
4.	Diskussion.....	60
	Abbildungsverzeichnis .....	65
	Tabellenverzeichnis .....	66
	Literaturverzeichnis .....	67
	Lebenslauf .....	75
	Danksagung.....	77
	Eidesstattliche Versicherung.....	78





## Zusammenfassung

Die Phenylketonurie ist eine angeborene, genetisch bedingte Funktionsstörung des Enzyms Phenylalaninhydroxylase, das unter Beteiligung des Kofaktors Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) Phenylalanin in Tyrosin überführt. Unbehandelt führt sie zu einer schweren geistigen und körperlichen Behinderung. Lange stand nur eine sehr belastende diätetische Therapie zur Verfügung. Die Zulassung von BH<sub>4</sub> als erstes pharmazeutisches Produkt zur Behandlung der Phenylketonurie durch Defekt der Phenylalaninhydroxylase stellte einen Paradigmenwechsel dar. Bei Markteinführung war der molekulare Wirkmechanismus von BH<sub>4</sub> nicht verstanden. *In vitro* Studien wiesen darauf hin, dass BH<sub>4</sub> als pharmakologisches Chaperon wirkt, das die fehlgefaltete PAH von PKU-Patienten gegen proteolytischen Abbau schützt. Ein Tiermodell für *in vivo* Untersuchungen zum Wirkmechanismus von BH<sub>4</sub> oder anderen therapeutischen Kandidatenmolekülen fehlte jedoch. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die murinen PKU Modelle *Pah*<sup>enu1</sup> und *Pah*<sup>enu1/2</sup> auf BH<sub>4</sub>-Verabreichung mit einer Steigerung der *in vivo* Phenylalaninoxidation reagieren, während *Pah*<sup>enu2</sup> Tiere nicht auf BH<sub>4</sub> ansprechen [Zsifkovits 2007, Lagler 2010, Gersting 2010].

In dieser Arbeit wurde/n

- (1) unter Anwendung mehrerer unabhängiger *in vivo* Methoden die Hypothese bestätigt, dass *Pah*<sup>enu1</sup> und *Pah*<sup>enu1/2</sup> murine Modelle der humanen BH<sub>4</sub> responsiven PKU sind,
- (2) die pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Effekte von BH<sub>4</sub> in beiden Modellen charakterisiert und die genotyp-spezifischen Unterschiede in der BH<sub>4</sub>-Pharmakodynamik identifiziert,
- (3) Phenylbutyrat als Kandidatenmolekül für die Behandlung der BH<sub>4</sub>-responsiven Phenylketonurie identifiziert,
- (4) experimentelle Testmethoden zur Evaluation der Wirksamkeit pharmakologischer Chaperone *in vivo* etabliert, welche in Zukunft bei der Entwicklung weiterer Medikamente Anwendung finden könnten.

## Abkürzungen

$^{12}\text{CO}_2$	Stabiles Kohlendioxid-Isotop mit 6 Neutronen innerhalb des Kohlenstoffatoms an Position 1
$^{13}\text{CO}_2$	Stabiles Kohlendioxid-Isotop mit 7 Neutronen innerhalb des Kohlenstoffatoms an Position 1
$^{12}\text{C-Phe}$	L-[1- $^{12}\text{C}$ ]-Phenylalanin; Stabiles Phenylalanin-Isotop mit 6 Neutronen innerhalb des Kohlenstoffatoms an Position 1
$^{13}\text{C-Phe}$	L-[1- $^{13}\text{C}$ ]-Phenylalanin; Stabiles Phenylalanin-Isotop mit 7 Neutronen innerhalb des Kohlenstoffatoms an Position 1
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BTBR	BTBR $T^f$ <i>tf/J</i> , Wildtyp-Mausstamm, der den genetischen Hintergrund von ENU-Mäusen repräsentiert
DOB	Delta over baseline; Maß für die fraktionierte Recovery (Tracerumsatz zu einem bestimmten Zeitpunkt)
ENU	N-Ethyl-N*-Nitroso-Urea (engl. f. N-Ethyl-N*-Nitroso-Harnstoff)
ENU1	siehe <i>Pah</i> <sup>enu1</sup>
ENU1/2	siehe <i>Pah</i> <sup>enu1/2</sup>
ENU2	siehe <i>Pah</i> <sup>enu2/2</sup>
HZE1	Heterozygot <i>Pah</i> <sup>enu1</sup>
HZE2	Heterozygot <i>Pah</i> <sup>enu2</sup>
MHP	Milde Hyperphenylalaninämie
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
NaCl	Physiologische Kochsalzlösung
PAH	Phenylalaninhydroxylase
<i>PAH</i>	Kodierendes Gen für die Phenylalaninhydroxylase
<i>Pah</i> <sup>enu1</sup>	BTBR.Cg- <i>Pah</i> <sup>enu1</sup> /J; Mausstamm mit Mutation <i>V106A</i> im <i>PAH</i> -Gen verursacht durch ENU-Mutagenese
<i>Pah</i> <sup>enu1/2</sup>	Mausstamm, der durch Kreuzung von <i>Pah</i> <sup>enu1/1</sup> und <i>Pah</i> <sup>enu2/2</sup> hervorgegangen ist
<i>Pah</i> <sup>enu2/2</sup>	BTBR- <i>Pah</i> <sup>enu2</sup> /J; Mausstamm mit Mutation <i>F263S</i> im <i>PAH</i> -Gen verursacht durch ENU-Mutagenese
PDB	Pee Dee Belemnite; Internationaler Standard bei $^{13}\text{C}$ -Atemtests, auf den sämtliche Ergebnisse bezogen werden
Phe	L-Phenylalanin
PKU	Phenylketonurie
PBA	Natrium-Phenylbutyrat
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>

# **1. Einleitung**

## **1.1. Grundlagen**

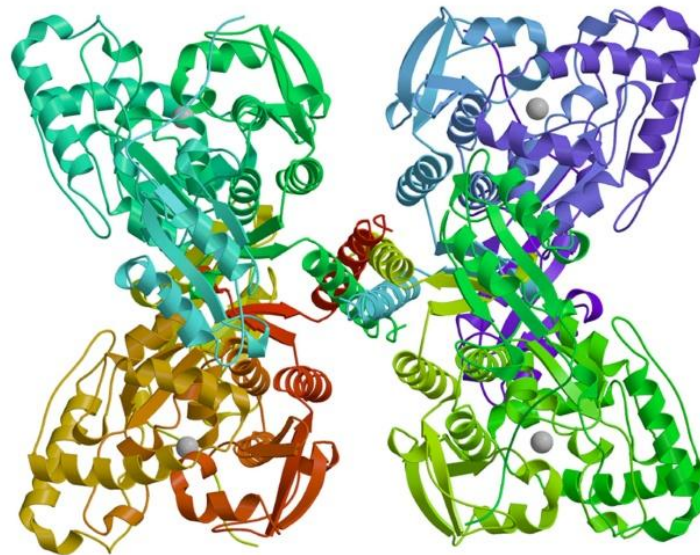
### **1.1.1. Die Phenylketonurie**

Bei der Phenylketonurie (PKU) handelt es sich um eine angeborene, genetisch bedingte Erkrankung, die unbehandelt zu schwerer geistiger und körperlicher Behinderung führt. Mit einer Inzidenz von etwa 1:6.000 bis 1:7.000 Neugeborene handelt es sich um den häufigsten genetischen Defekt im Aminosäurestoffwechsel [Muntau et al., 2000; Scriver et al., 2000]. Bei etwa 2% der Fälle ist ein Mangel des Kofaktors Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) Ursache für die Hyperphenylalaninämie. In 98% der Fälle ist sie bedingt durch eine Defizienz des Enzyms Phenylalaninhydroxylase (PAH; EC-Nummer 1.14.16.1), hervorgerufen durch eine Mutation im *PAH*-Gen auf Chromosom 12q23.2 [Scriver et al., 2000]. Bisher sind 833 krankheitsverursachende Mutationen [Blau, 2013] bekannt, die zu unterschiedlichen Aktivitätsminderungen der Phenylalaninhydroxylase in der Leber führen (Abbildung 1).

Die Heterozygotenfrequenz für alle Formen der Hyperphenylalaninämie liegt bei etwa 1:40. Die entsprechenden Phänotypen reichen in ihrem Schweregrad von der klassischen Phenylketonurie (PKU) mit Plasmaphenylalaninkonzentrationen von über 1200 µmol/l, über die milde Phenylketonurie mit Plasmaphenylalaninkonzentrationen von über 600 µmol/l bis hin zur milden Hyperphenylalaninämie (MHP) mit Plasmaphenylalaninkonzentrationen von 120 – 600 µmol/l [Muntau et al., 2000; Lagler et al., 2010]. Durch die PAH erfolgt der Abbau der essentiellen Aminosäure Phenylalanin zu Tyrosin (Abbildung 2). Infolge des gestörten Abbaus bei PAH-Defizienz kommt es zu einer Akkumulation von Phenylalanin im Körper. Gleichzeitig wird weniger Tyrosin gebildet, das dadurch zur essentiellen Aminosäure wird. Das überschüssige Phenylalanin wird durch Aktivierung alternativer Stoffwechselwege zu den phenolischen Säuren Phenylpyruvat, Phenylazetat und Phenyllaktat abgebaut. Hohe Konzentrationen von Phenylalanin und seinen Metaboliten sind toxisch und schädigen insbesondere das zentrale Nervensystem. Das kindliche Gehirn ist diesbezüglich besonders vulnerabel.

Unbehandelt kann die Erkrankung daher zu schwersten neurologischen Symptomen und zu einer hochgradigen mentalen Retardierung führen [Burgard et al., 1999; Burgard et al., 1996;

Holtzmann et al.; 1986]. Hohe Phenylalaninkonzentrationen hemmen zusätzlich die Aktivität der Tyrosin- und der Tryptophanhydroxylase, wodurch es zu einem Defizit der Neurotransmitter Dopa, Dopamin und Serotonin sowie Melanin kommt [Muntau et al.; 2000; Blau et al., 2003]. Patienten mit klassischer und milder Phenylketonurie benötigen eine lebenslange strenge phenylalaninarme Diät, um neurologische Symptome zu vermeiden und um eine normale kognitive Entwicklung zu erreichen. Die Notwendigkeit, die MHP zu behandeln, wird kontrovers diskutiert. Die Diät ist für die Patienten und ihre Familien extrem belastend [MacDonald, 2000; MacDonald et al.; 1997; Realmuto et al. 1986; Weglage et al.; 1996; Weglage et al.; 1992], mit dem Risiko der Fehlernährung assoziiert [Acosta et al.; 1987; Jochum et al.; 1997; Lombeck et al.; 1978; Muntau et al.; 2002b; Reilly et al.; 1990; Sanjurjo et al.; 1994; Kure et al.; 1999] und führt zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität. Durch die hohen Anforderungen der Diät ist die Adhärenz häufig unbefriedigend. Dies führt durch die Akkumulation der toxischen Metabolite zu einem schlechten neurologischen Langzeitergebnis bis hin zur geistigen Behinderung. Alternative Behandlungsmethoden sind daher dringend erforderlich.



*Abbildung 1:* Die Phenylalaninhydroxylase

Die Phenylalaninhydroxylase (EC-Nummer 1.14.16.1) ist ein zytosolisches Enzym, das fast ausschließlich in Hepatozyten vorkommt. Es handelt sich um ein Homo-Tetramer, bestehend aus zwei Dimeren, die wiederum aus jeweils zwei Monomeren aufgebaut sind [The Stevens Laboratory, 2013].

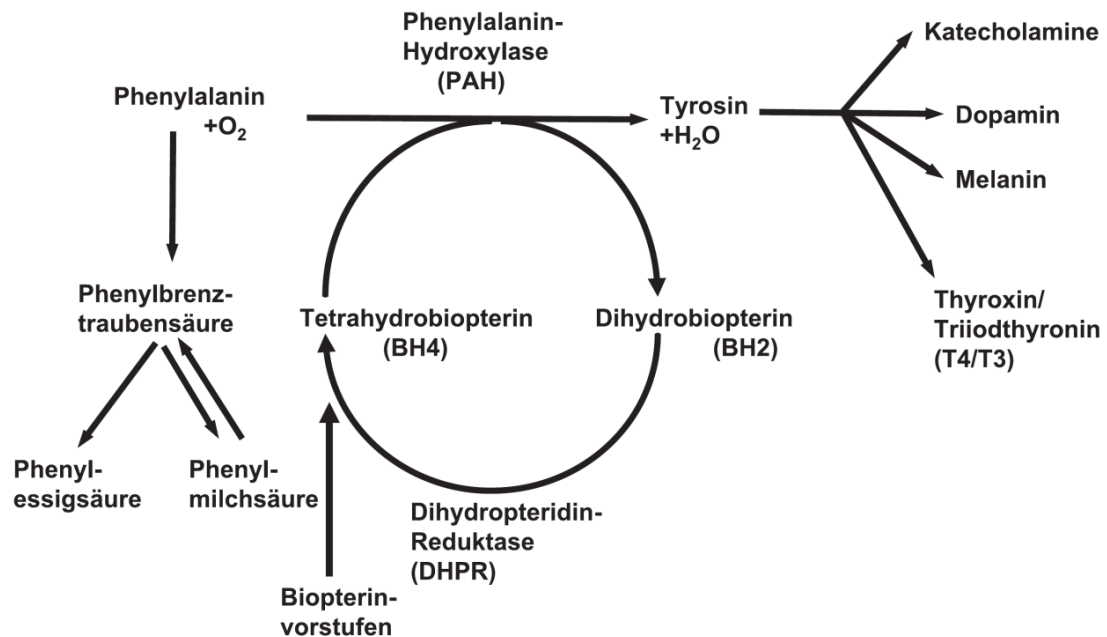


Abbildung 2: Der Stoffwechsel von Phenylalanin und Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>)

Die Phenylalaninhydroxylase (PAH) katalysiert die Umwandlung von Phenylalanin zu Tyrosin. Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) ist das Koenzym der PAH. BH<sub>4</sub> wird in mehreren Schritten aus Guanosintriphosphat (GTP) synthetisiert. Die Dihydropteridinreduktase (DHPR) regeneriert BH<sub>4</sub> aus BH<sub>2</sub> [Mütze et al., 2011].

### 1.1.2. Tetrahydrobiopterin und die Behandlung von PAH-defizienten Patienten

Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) ist eine körpereigene Substanz, die unter anderem als Kofaktor der Phenylalaninhydroxylase (PAH) wirkt. Die Biosynthese von BH<sub>4</sub> aus Guanosin-Triphosphat verläuft über zwei Zwischenprodukte, Dihydroneopterin-Triphosphat und 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin. Die für das Phenylalaninhydroxylierungssystem essentielle Regeneration von BH<sub>4</sub> aus BH<sub>2</sub> erfolgt mit Hilfe der Dihydropteridin-Reduktase (Abbildung 2). Medikamentös wird BH<sub>4</sub> bei seltenen angeborenen Störungen der Biosynthese und Regeneration von BH<sub>4</sub> seit über drei Jahrzehnten erfolgreich eingesetzt [Danks et al., 1975; Smith et al., 1985].

Bei Patienten mit PAH-Defizienz wurde eine therapeutische Behandlung mit BH<sub>4</sub> lange nicht in Betracht gezogen, da diese Patienten erhöhte BH<sub>4</sub>-Werte im Plasma aufweisen, die durch einen Feedback-Mechanismus hervorgerufen werden. Zudem bestand kommerziell verfügbares BH<sub>4</sub> in der Vergangenheit zu 66,6% aus biologisch aktivem 6R-BH<sub>4</sub> und zu 33,3% aus inaktivem 6S-BH<sub>4</sub>, sodass BH<sub>4</sub>-Belastungstests bis 1999 mit viel niedrigeren

Konzentrationen der aktiven Substanz durchgeführt wurden. Ein weiterer Grund für die späte Entdeckung der BH<sub>4</sub>-sensitiven PAH-Defizienz ist die in der Vergangenheit zu kurz gewählte Untersuchungsdauer von durchschnittlich 8 Stunden, die eine Detektion von langsamen Respondern unmöglich machte [Bernegger and Blau, 2002].

Kure und Mitarbeiter beschrieben erstmals 1999 vier Patienten mit PAH-Defizienz, die überraschend auf die orale Gabe von BH<sub>4</sub> mit einem Abfall der Phenylalaninkonzentration im Plasma reagierten [Kure et al., 1999]. Mittlerweile haben Fallstudien und klinische Beobachtungsstudien gezeigt, dass BH<sub>4</sub> in einer Dosis von 5-20 mg/kg Körpergewicht die beeinträchtigte Funktion der PAH in den meisten Fällen von milder PKU und MHP korrigieren bzw. verbessern kann [Kure et al., 1999; Bernegger and Blau, 2002; Cerone et al., 2004; Desviat et al., 2004; Hennermann et al., 2002; Matalon et al., 2004; Muntau et al., 2002a; Perez-Duenas et al., 2004; Shintaku et al., 2004; Spaapen and Rubio-Gozalbo, 2003; Trefz et al., 2005; Belanger-Quintana et al., 2005; Fiori et al., 2005; Hennermann et al., 2005]. Etwa 40% - 60% aller PAH-Defizienzen sind BH<sub>4</sub>-sensitiv [Zurflüh, 2008; Muntau and Gersting, 2010] und können von einer Behandlung mit dem Kofaktor profitieren. 2007 (FDA) und 2008 (EMA) wurde die synthetische Form von BH<sub>4</sub> (Sapropterindihydrochlorid) als Arzneimittel zur Behandlung von Patienten mit BH<sub>4</sub>-sensitiver PKU zugelassen [Feillet et al., 2008; Lee et al., 2008; Levy et al., 2007; Trefz et al., 2009].

Lange war der Mechanismus der BH<sub>4</sub>-sensitiven PKU unklar. Hypothesen hierzu beinhalteten unter anderem den Schutz der fehlgefalteten PAH vor Degradation durch Proteasen aufgrund einer Chaperon-artigen Funktion von BH<sub>4</sub> [Doskeland and Flatmark, 1996; Erlandsen et al., 2004; Pey and Martinez, 2005; Thöny et al., 2004]; oder die Verbesserung des Bindungsverhaltens so genannter K<sub>m</sub>-Varianten der PAH an den Kofaktor [Erlandsen and Stevens, 2001; Erlandsen et al., 2003; Erlandsen et al., 2004; Pey and Martinez, 2005; Thöny et al., 2004]. Die Klärung der zugrunde liegenden Mechanismen und die Entwicklung alternativer Behandlungsmethoden wurden durch das Fehlen eines Tiermodells für die BH<sub>4</sub>-responsive PKU erheblich erschwert. Es ist bekannt, dass die PAH ein stark reguliertes Enzym ist, welches durch das Substrat Phenylalanin in eine aktivierte, instabile Form und vom Kofaktor BH<sub>4</sub> in eine stabile, aber inaktive „Ruheform“ überführt wird [Shiman1994a, Shiman1994b, Xia1994]. *In vitro* und *in vivo* Tests zeigten, dass eine Verabreichung von BH<sub>4</sub> in *Pah<sup>enu1</sup>* die Menge korrekt gefalteten Enzyms und somit die Menge an funktioneller PAH

erhöht und somit der Kofaktor als pharmakologisches Chaperon (Stabilisierung der PAH und Schutz vor Denaturierung) wirkt [Gersting et al., 2010; Aguado et al., 2006; Erlandsen et al., 2004; Perez et al., 2005; Pey et al., 2004; Muntau and Gersting, 2010]. Dieser Effekt übersteigt bei der BH<sub>4</sub>-responsiven PKU den inhibierenden Effekt von BH<sub>4</sub> auf die PAH und führt damit zu einer erhöhten Aktivität der PAH [Gersting et al., 2010]. Ein pharmakologisches Chaperon ist ein kleines Molekül, das über die Unterstützung des Faltungsprozesses und durch Stabilisierung der Proteinstruktur die Proteinfunktion verbessert [Muntau and Gersting, 2010].

Die Herstellung des reinen, biologisch aktiven R-Enantiomers von BH<sub>4</sub> ist teuer. Die derzeitigen Kosten für 100 mg Kuvan® von Biomarin belaufen sich auf 29 US Dollar [National PKU News, 23.03.2009], d.h., eine Therapie mit 10-20 mg/kg täglich kostet in Abhängigkeit von Körpergewicht und Dosis ca. 50-150.000 USD pro Jahr für erwachsene Patienten. Kostengünstigere Alternativen mit der gleichen Wirkung wie BH<sub>4</sub> sind aus diesem Grund von Interesse. Darüber hinaus existieren Fallstudien, die darauf hinweisen, dass sowohl die Bioverfügbarkeit von BH<sub>4</sub> als auch das Ansprechen auf BH<sub>4</sub> mit zunehmendem Alter der Kinder abnimmt [Shintaku et al., 2005]. Alternative Präparate z.B. mit einer besseren Bioverfügbarkeit wären daher sehr wünschenswert [Shintaku et al., 2005]. Eine *In vitro*-Testung solcher Kandidaten-Moleküle am gereinigten rekombinanten Protein oder in Zellkultur-Systemen ist zwar möglich, für ein besseres Verständnis zu Wirkmechanismen und Unbedenklichkeit *in vivo* sind Tiermodelle jedoch von großer Bedeutung.

### **1.1.3. Phenylbutyrat als Behandlungsalternative**

Die Phenylalaninhydroxylase (PAH) ist ein zytosolisches Enzym, dessen Umsatzgeschwindigkeit von zytosolischen Chaperonen und vom Proteasesystem abhängig zu sein scheint [Gregersen, 2006]. Bis heute konnte der komplizierte Faltungsprozess der PAH nicht gänzlich geklärt werden. Gersting et al. zeigten, dass Punktmutationen im *PAH*-Gen nicht nur zu Proteinefehlfaltung führen, sondern auch unterschiedlich stark ausgeprägte Konformationsänderungen des PAH Proteins verursachen [Gersting et al., 2008]. Aufgrund einer Zerstörung von Netzwerken aus Aminosäureseitenketten kommt es vermutlich zur Fehlfaltung der PAH und damit zu einem Funktionsverlust des Enzyms [Gersting et al., 2008]. Auch andere Erkrankungen wie z.B. der Carbamoylphosphat-Synthetase-Mangel oder der Ornithin-Carbamoyl-Transferase-Mangel unterliegen dem Pathomechanismus der

Proteinfehlfaltung. Ansätze für Therapiemöglichkeiten bei solchen Krankheiten sind die Verbesserung der Faltung der Proteine und somit die Bereitstellung größerer Mengen funktionellen Enzyms. Natürlich vorkommende molekulare Chaperone (z.B. *Heat Shock Protein* Hsp40; Hsp70; Hsp90) unterstützen die Faltung von Enzymen. Es hat sich gezeigt, dass neben den molekularen Chaperonen auch chemische Chaperone (CC; unspezifische Bindung) oder pharmakologische Chaperone (PC; Bindung an aktive Zentren) die Faltung von Enzymen unterstützen. Zum Beispiel werden pharmakologische Chaperone bereits erfolgreich zur Behandlung des Carbamoylphosphatsynthetase-Mangels sowie dem Ornithin-Carbamoyl-Transferase-Mangels eingesetzt [Maestri and Brusilow, 1996]. Auch der Effekt von BH<sub>4</sub> wird darauf zurückgeführt, dass es als PC wirkt. Phenylbutyrat (PBA) und zum Beispiel Gallensäurederivate wie Tauroursodesoxycholsäure (TUDC) sind Verbindungen, die als pharmakologische Chaperone Proteinkonformationen stabilisieren, die Faltung, den Transport und die Aktivität von Proteinen regulieren und bei der Elimination von beschädigten oder denaturierten Proteinen eine Rolle spielen [Cashikar et al., 2005]. Vor allem in Stresssituationen werden Chaperone (z.B. Hitzeschockproteine) zur Stabilisation von Proteinen freigesetzt [Koch, 2003]. Özcan et al. [2006] konnte in einem Mausmodell für Typ2 Diabetes zeigen, dass eine Behandlung mit PBA und TUDC aufgrund der Reduktion von „Stress“ im endoplasmatischen Retikulum zur Normalisierung der Hyperglykämie und zur Verbesserung der Insulinempfindlichkeit führt. Aufgrund der Ergebnisse von Özcan et al. haben wir den Effekt von PBA auf die Phenylalaninoxidation im Mausmodell untersucht. Als Behandlungsalternative der PKU ist PBA besonders interessant, da es bereits ein zugelassenes Medikament (z.B. für die Behandlung von Harnstoffzyklusdefekten oder der Cystischen Fibrose) und kostengünstiger als BH<sub>4</sub> ist.

Um Wirksamkeit und Unbedenklichkeit von PBA *in vivo* nachzuweisen, haben wir Tiermodell-Studien an der *Pah<sup>enu1</sup>* und *Pah<sup>enu1/2</sup>* Maus durchgeführt.

#### **1.1.4. Phenylbutyrat (PBA)**

Natriumphenylbutyrat (orales Präparat: Ammonaps®) ist eine aromatische Fettsäure, die mittels  $\beta$ -Oxidation in der Leber zu Phenylacetat verstoffwechselt wird [EMA, 2009]. Phenylacetat wird sowohl in der Leber als auch in der Niere durch Acetylierung mit Glutamin



zu Phenylacetylglutamin konjugiert. Dieses Konjugat ist wasserlöslich und wird über die Nieren ausgeschieden [EMA, 2009].

Ammonaps® ist unter anderem indiziert als Zusatztherapie bei der Langzeitbehandlung von Stoffwechselstörungen des Harnstoffzyklus und zur Behandlung von Patienten mit Cystischer Fibrose [Koch, 2003]. Die Rolle von PBA als Histon-Deacetylase-Inhibitor bei der Genexpression und Zelldifferenzierung erklärt die therapeutischen Effekte von PBA in der Onkologie [Koch, 2003]. Kontraindiziert ist das orale Präparat bei Patienten mit Schluckstörungen, da ein Risiko für die Entstehung von Ösophagusulzera besteht, wenn die Tabletten nicht sofort in den Magen gelangen. Zusätzliche Vorsicht ist bei Schwangerschaft, Stillzeit oder Überempfindlichkeit gegen den Wirkstoff oder einen anderen Bestandteil des Medikaments geboten [EMA, 2009].

In klinischen Studien betrafen unerwünschte Nebenwirkungen im Wesentlichen die Geschlechtsorgane (sehr häufig: Amenorrhoe, unregelmässige Menstruation) und den Gastrointestinaltrakt (sehr häufig: Magenschmerzen, Erbrechen, Übelkeit, Obstipation, Dysgeusie). Im nüchternen Zustand wird Phenylbutyrat schnell resorbiert. Nach einer oralen Einzeldosis von 5 g Natriumphenylbutyrat in Tablettenform werden 15 Minuten nach der Einnahme messbare Plasmakonzentrationen von Phenylbutyrat festgestellt. Zwischen der Einnahme und dem Erreichen des maximalen Plasmaspiegels vergehen im Mittel 1,35 Stunden, und die mittlere Höchstkonzentration beträgt 218 µg/ml. Die Eliminationshalbwertszeit wird auf 0,8 Stunden geschätzt. Der Einfluss von Nahrung auf die Resorption ist bisher nicht bekannt. Das Verteilungsvolumen von Phenylbutyrat beträgt 0,2 l/kg, Molekulargewicht: 186,20 g/mol, Summenformel:  $C_{10}H_{11}NaO_2$  [EMA, 2009].

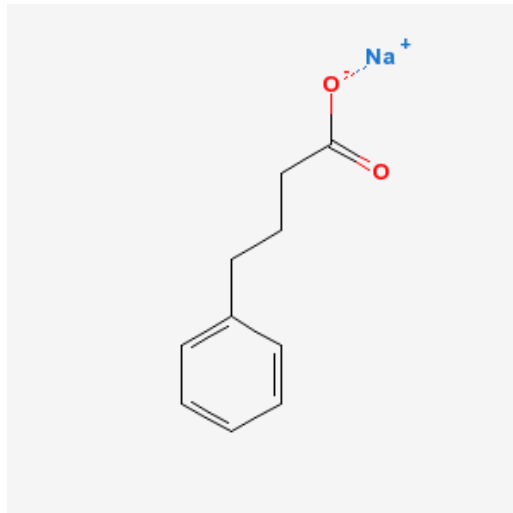


Abbildung 3: Strukturformel von Na-Phenylbutyrat [Pubchem Compound, 2009]

#### 1.1.5. BTBR, $Pah^{enu1}$ , $Pah^{enu1/2}$ , $Pah^{enu2}$ als Tiermodelle für die PAH-Defizienz

$Pah^{enu1}$ ,  $Pah^{enu1/2}$  und  $Pah^{enu2}$  sind Mäuse mit BTBR Hintergrund, die durch N-Ethyl-N\*-Nitroso-Harnstoff (ENU) im *Pah*-Gen mutagenisiert wurden und erhöhte Phenylalaninkonzentrationen im Blut aufweisen. Die Tiere zeigen eine Defizienz der Phenylalaninhydroxylase [Sarkissian et al., 2000]. Metabolische Untersuchungen und Verhaltenstests weisen darauf hin, dass die Mäuse als Tiermodell für die humane PKU geeignet sind [Sarkissian et al., 2000; McDonald et al., 2002]. Dabei entspricht  $Pah^{enu2}$  der klassischen PKU,  $Pah^{enu1}$  der MHP und die compound heterozygote Maus  $Pah^{enu1/2}$  der milden PKU [Lagler et al., 2010]. Die  $BH_4$ -Sensitivität dieser Stämme wurde noch nicht untersucht [McDonald et al., 2002]. Eine Arbeit hat gezeigt, dass  $BH_4$  bei  $Pah^{enu2}$  nicht zu einer Steigerung der Phenylalaninoxidation führt [Kure et al., 2004]. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da die F263S Mutation bei  $Pah^{enu2}$  zu einer beinahe vollständig fehlenden Enzymaktivität führt. Für den Phänotyp der  $BH_4$  Responsivität ist jedoch eine signifikante Restenzymaktivität erforderlich [Gersting et al., 2010; Blau et al., 2010].

#### 1.1.6. Quantifizierung der Phenylalaninoxidationsrate *in vivo* mittels L-[1- $^{13}C$ ]-Phenylalanin Atemtest

Im Rahmen von Atemtests mit stabilen Isotopen wird Patienten eine isotonen-markierte Substanz (Tracer) verabreicht und der Abbau dieser Substanz entsprechend seines Stoffwechselweges im Organismus verfolgt.  $^{13}C$  besitzt gegenüber  $^{12}C$  ein zusätzliches

Neutron. Seine natürliche Häufigkeit liegt mit 1,1 % deutlich unter der von  $^{12}\text{C}$  (98,9 %). Im Tracer wird der Kohlenstoff  $^{12}\text{C}$  an einer definierten Position zu 99 % durch das Isotop  $^{13}\text{C}$  ersetzt. Der Abbau des Tracers im Organismus zu  $^{13}\text{CO}_2$  wird durch ein erhöhtes  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ -Verhältnis (Ratio) in der Atemluft nachgewiesen. Die Messung des Isotopenverhältnisses kann mit Hilfe eines Massenspektrometers oder eines Infrarotspektrometers erfolgen.

Um die Methode zu vereinheitlichen, werden Ergebnisse üblicherweise auf den Standard Pee Dee Belemnite (PDB) bezogen. Er stammt von der  $\text{CO}_2$ -Isotopenratio eines marinen Fossils der Kreidezeit, *Belemnitella americana*, aus der *Pee Dee Formation in South Carolina/USA*. Die Abweichung der Ratio einer Atemprobe von PDB ( $\Delta^{13}\text{C}$ ), angegeben in Per mille, berechnet sich nach der Gleichung  $\Delta^{13}\text{C} = [(^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{Probe}}/\text{PDB}) - 1] \cdot 1000$ . Da die Ratio  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  in den meisten natürlichen Substanzen und so auch in spontanen (vor Tracerapplikation) Atemproben kleiner ist als in PDB, ergeben sich meist negative  $\Delta^{13}\text{C}$ -Werte als Ausgangswerte.

Die  $\Delta^{13}\text{C}$ -Werte eines gesamten  $^{13}\text{C}$ -Atemtests können unterschiedlich dargestellt und ausgewertet werden: Die fraktionierte Recovery (Tracerumsatz zu einem definierten Zeitpunkt) ermöglicht die Darstellung der Umsatzdynamik und damit unter anderem die Bestimmung des Aktivitätsmaximums. Sie wird entweder mit Hilfe von Delta over baseline-Werten (DOB) oder als Dosisrate (dose/h) dargestellt. Die Dosisrate gibt an, wieviel Prozent der verabreichten Dosis pro Stunde umgesetzt werden. Die kumulative Recovery (Tracerumsatz von Tracerapplikation bis zu einem bestimmten Zeitpunkt) ist ein Maß für die gesamte Enzymaktivität.

Der L-[1- $^{13}\text{C}$ ]-Phenylalaninatemtest ist eine gut etablierte Methode zur Quantifizierung der Phenylalaninoxidationsrate *in vivo* [Treacy et al., 1997; Muntau et al., 2002a]. Entsprechend dem physiologischen Phenylalaninstoffwechsel wird L-[1- $^{13}\text{C}$ ]-Phenylalanin durch die PAH zu  $^{13}\text{C}$  markiertem Tyrosin hydroxyliert. Die folgenden Oxidationsschritte führen schließlich zur Freisetzung von  $^{13}\text{CO}_2$  (Abbildung 4). Durch die Messung der Isotopen-Ratio von  $^{13}\text{CO}_2$  und  $^{12}\text{CO}_2$  kann die Phenylalaninoxidationsrate des gesamten Körpers bestimmt werden. Diese korreliert mit der PAH-Aktivität, da die Phenylalaninhydroxylase das geschwindigkeitsbestimmende Enzym im Phenylalaninstoffwechsel darstellt [Ito et al., 2001].

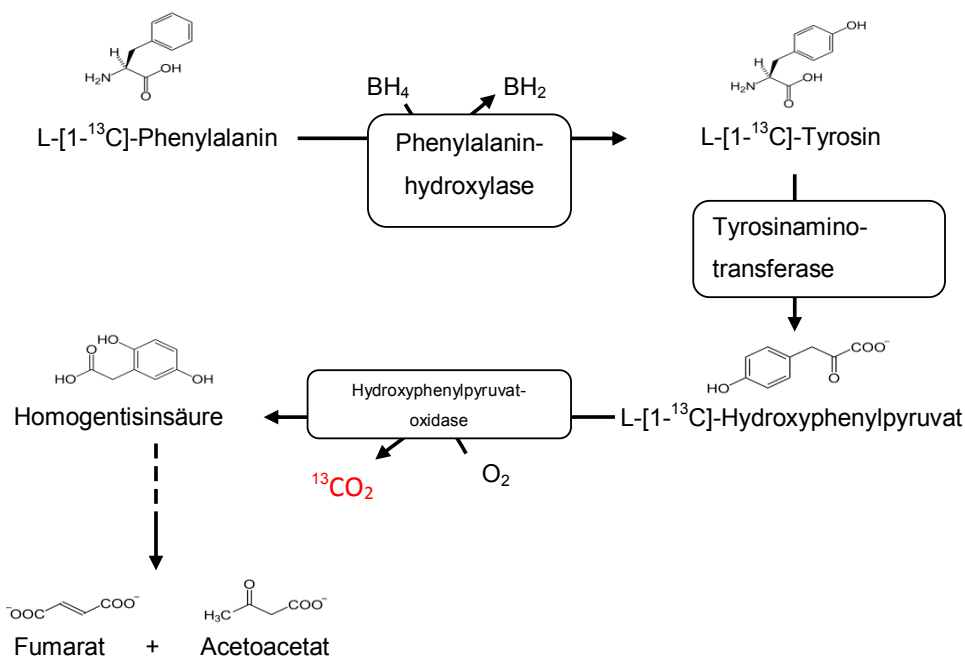


Abbildung 4: Weg der L-[1-<sup>13</sup>C]-Phenylalaninoxidation und <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Produktion [Zsifkovits, 2007]

In Säugetieren wird <sup>13</sup>C-Phenylalanin durch die Phenylalaninhydroxylase abgebaut. Dabei handelt es sich um einen irreversiblen Schritt. Die Aminogruppe des Tyrosins geht durch Transaminierung zu  $\alpha$ -Ketoglutonsäure oder -pyruvat verloren. Das resultierende Hydroxyphenylpyruvat wird durch das zytosolische Enzym p-Hydroxyphenylpyruvatoxidase in Homogentisinsäure umgewandelt. Bei diesem Schritt wird <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> freigesetzt, in dem das Enzym Hydroxyphenylpyruvat in para-Position hydroxyliert und die Pyruvatseitenkette unter Freisetzung von <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> verändert. Weitere Schritte führen zu Fumarat und Acetoacetat. Da die PAH der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, ist die Phenylalaninoxidation ein direktes Maß für die PAH-Aktivität im Organismus.

Mit Hilfe des L-[1-<sup>13</sup>C]-Phenylalanin-Atemtests kann der Gen-Dosis-Effekt der PAH-Defizienz beim Menschen erfasst werden. Darüber hinaus wurde er erfolgreich bei der Beurteilung der BH<sub>4</sub>-Sensitivität von PAH-defizienten Patienten eingesetzt [Muntau et al., 2002a; Okano et al., 2004]. Atemtests an Mäusen wurden bereits mit verschiedenen anderen stabilen Isotopen durchgeführt [Hammond et al., 1999; Martins et al., 2000; Symonds et al., 2002; Symonds et al., 2000]. Die Durchführbarkeit eines L-[1-<sup>13</sup>C]-Phenylalanin-Atemtests an Mäusen mit Hilfe eines Infrarotspektrometers wurde bereits gezeigt [Kure et al., 2004]. Die Wiederholbarkeit des Atemtests erlaubt die

Durchführung von *Crossover*-Studiendesigns, bei denen die gleichen Versuchstiere mehrmals unter verschiedenen Bedingungen (Placebo vs. Verum) getestet werden können. Die Beeinflussung der Ergebnisse durch interindividuelle Variabilität kann dadurch minimiert werden. Im Vergleich zum *in vitro*-PAH-Aktivitäts-Assay, für den das Versuchstier geopfert werden muß, spart der Atemtest Zeit und Ressourcen (vor allem Versuchstiere). Zusätzlich ermöglicht er ein kontinuierliches Monitoring der Enzymfunktion über Stunden, so dass die zeitliche Dynamik von Behandlungseffekten erfasst werden kann. Die Tatsache, dass die Methode beim Menschen etabliert und einfach durchführbar ist, kann für eine effiziente Übertragung von präklinischen Erkenntnissen auf klinische Studien von großem Nutzen sein.

## 1.2. Zielsetzung

Übergeordnetes Ziel unserer Arbeitsgruppe ist es, die Therapie von Patienten mit PKU zu optimieren. In dieser Arbeit sollten grundlegende pharmakodynamische Effekte von BH<sub>4</sub> und Phenylbutyrat im Sinne von *alternativen compounds* zur Behandlung der PKU in PAH-defizienten Mäusen und korrespondierenden Wildtypmäusen mittels L-[1-<sup>13</sup>C]-Phenylalanin Atemtest charakterisiert werden.

Hierzu wurden folgende Ziele definiert:

- (1) Charakterisierung von Wildtypmäusen und PAH-defizienten Mäusen unterschiedlicher Genotypen in Bezug auf die Phenylalaninkonzentration im Blut und auf die Phenylalaninoxidation *in vivo*
- (2) Untersuchung der Regulation der PAH durch Substrat und Kofaktor im Mausmodell
- (3) Untersuchung des pharmakodynamischen Effektes von BH<sub>4</sub> im Mausmodell in Bezug auf die Phenylalaninkonzentration im Blut, die Phenylalaninoxidation *in vivo* sowie die Phenylalanin-Clearance
- (4) Untersuchung der Pharmakokinetik von BH<sub>4</sub> im Mausmodell
- (5) Untersuchung des pharmakodynamischen Effektes von Na-Phenylbutyrat im Mausmodell in Bezug auf die Phenylalaninkonzentration im Blut, die Phenylalaninoxidation *in vivo* sowie die Phenylalanin-Clearance

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1. Substanzen**

#### **2.1.1. L-[1-<sup>13</sup>C]-Phenylalanin (Tracer, <sup>13</sup>C-Phe)**

L-[1-<sup>13</sup>C]-Phenylalanin (99%) , Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover MA USA

CAS Nummer 81201-86-7

#### **2.1.2. Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>)**

Tetrahydro-L-biopterin (dihydrochlorid), Cayman Chemical Company, Tallin Estonia

CAS Nummer 69056-38-8

#### **2.1.3. Phenylbutyrat**

Na-4-Phenylbutyrat Ammonaps® Granulat 940mg/g, Swedish Orphan

CAS Nummer 1821-12-1

PZN Nummer 954685

#### **2.1.4. Phenylalanin (Phe)**

L-Phenylalanin (≥98%), Sigma-Aldrich Co., St. Louis USA

CAS Nummer 63-91-2

#### **2.1.5. NaCl**

Physiologische Kochsalzlösung(0,9%) "Braun", B. Braun Melsungen AG

Ch.-B.: 4101A142

#### **2.1.6. PBS**

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x)

Without Ca&Mg, PAA Laboratories GmbH, Pasching Austria

CAS Nummer 7558-79-4

#### **2.1.7. Ascorbat**

L(+)-Ascorbinsäure, Merck KGaA, Darmstadt Germany

CAS Nummer 50-81-7

#### **2.1.8. Atemkalk**

DiveSorb, Dräger Safety AG & Co. KGaA, Lübeck Germany

Enthält: Calciumhydroxid, Alkaliphosphat

Korngröße: Ø ca. 4mm ISO3310, 2-4 mm ASTM E11, 5- 10 No

Wassergehalt: 16±2%

Schüttdichte: 830±g/L

#### **2.1.9. Chlorhämmin**

C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>ClFeN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>; M:651,96 g/mol,

CAS-Nummer 16009-13-5, Roth

### **2.2. Präparation der Injektionslösungen**

#### **2.2.1. L-[1-<sup>13</sup>C]-Phenylalanin (Tracer)**

Bei reiner Tracerinjektion (L-[1-<sup>13</sup>C]-Phenylalanin) wurden je nach Versuchsaufbau zwischen 1,25 und 20 mg/kg Körpergewicht in isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) mit Ascorbat (1%) als Antioxidans so gelöst, dass sich ein Injektionsvolumen von 5 µl/g Körpergewicht ergab.

#### **2.2.2. Tetrahydrobiopterin**

Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) wurde in den Dosierungen 10, 20, 40, 60 und 80 mg/kg Körpergewicht appliziert. Dabei wurden BH<sub>4</sub> und Tracer in NaCl + Ascorbat gelöst und anschließend gemeinsam so appliziert, dass sich ein Injektionsvolumen von 5 µl/g Körpergewicht ergab.

#### **2.2.3. Phenylalanin**

Phenylalanin (Phe) wurde in der Dosierung 500 mg/kg KG appliziert. Dabei wurde Phe allein als sogenannter Phe-Load eine halbe Stunde vor BH<sub>4</sub> + Tracer i.p. injiziert. Es wurde in isotoner Kochsalzlösung (NaCl) bei 40°C gelöst.

Temperatur (in °C)	Löslichkeit in Wasser (in g/l)
20	27,0
35	29,6
50	44,3
75	66,2

*Tabelle 1:* Löslichkeit von Phenylalanin in Wasser in Abhängigkeit der Temperatur [Merck online, 2009]

Aufgrund der Löslichkeit von Phenylalanin in Wasser (siehe Tabelle 1) reichte ein Injektionsvolumen von 5 µl/g (wie bei PBA) nicht aus, sondern es wurden 16,67 µl/g Maus injiziert.

#### **2.2.4. Phenylbutyrat (PBA)**

Phenylbutyrat (verwendet wurde das orale Präparat Ammonaps®) wurde in den Dosierungen 50, 100, 250, 500 mg/kg KG appliziert. In Lösung wurde es in Phosphate Buffered Saline (PBS) gebracht. Zur vollständigen Auflösung wurde die Lösung 2 x 10 Minuten bei 13 rpm zentrifugiert. Dabei vielen Salze aus, die als Rückstand nicht zur Injektionslösung beitrugen. Das Injektionsvolumen betrug 5µl/g KG.

### **2.3. Versuchsaufbau**

#### **2.3.1. Grundprinzip**

Zentraler Bestandteil des Versuchsaufbaus war das Infrarotspektrometer (IRIS DOC, infrared Isotope Analyzer, Wagner Analysen Technik GmbH), mit dessen Hilfe das Verhältnis von  $^{13}\text{CO}_2$  zu  $^{12}\text{CO}_2$  in der Atemprobe gemessen wurde (siehe 2.4.6.3). Die erhobenen Daten wurden von der IRIS-Software gespeichert und ausgewertet. Die parallele online-Messung von bis zu 6 Mäusen wurde durch das Mausmodul des Gerätes ermöglicht. Dabei wurde unter online-Messung die unmittelbare Messung der Atemprobe nach ihrer Gewinnung verstanden.

Während des Testes befanden sich die Mäuse in speziell angefertigten Plexiglasröhren (Abbildung 5). An den Enden dieser Röhren befanden sich Gummistopfen zum einen mit



einer Verbindung zum Spektrometer, zum anderen mit einem Anschluss an die Gasleitung. Die Zufuhr flowkontrollierter CO<sub>2</sub>-freier Luft über diese Gasleitungen versorgte einerseits die Tiere mit Frischluft, andererseits transportierte sie im Anschluss an die Akkumulationszeit die Atemprobe in die Messeinheit des Infrarotspektrometers. Um die Entstehung von Kondenswasser in den Röhren während der Untersuchung zu vermeiden wurde die Umgebungstemperatur der Plexiglasröhren mittels einer eigens dafür konstruierten Wärmevorrichtung konstant hoch (zw. 29-30°C) gehalten.

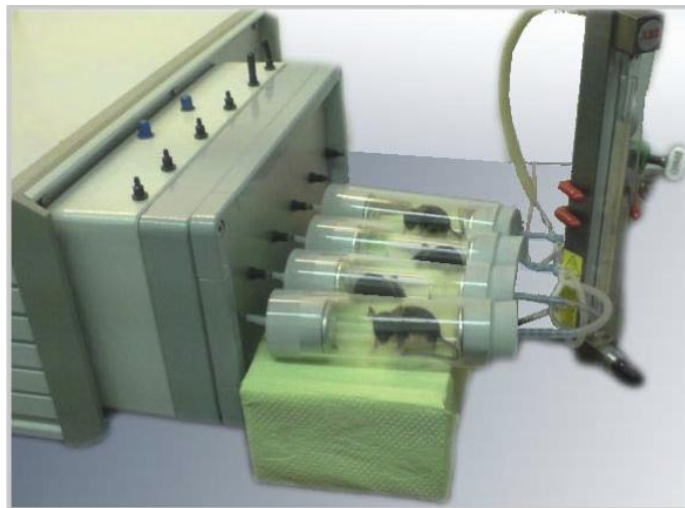


Abbildung 5: Maus-Atemtest

### 2.3.2. Optimierung des Versuchaufbaus

Versuchsaufbau und Konfiguration des Messgerätes wurden optimiert, um folgende Qualitätskriterien möglichst vollständig zu erfüllen:

- Vermeidung von CO<sub>2</sub>-Konzentrationen unter 0,8% in allen Atemproben zur Sicherung optimaler Messgenauigkeit
- Vermeidung anhaltender supraphysiologischer CO<sub>2</sub> Konzentrationen in den Röhren, zur Minimierung der Belastung für die Tiere
- Vermeidung der Entstehung von Kondenswasser in den Versuchsröhren mittels Wärmevorrichtung
- Kurze Messintervalle im Sinne einer hohen Auflösung
- Gleichzeitige Untersuchung von bis zu 4 Tieren im Sinne einer maximalen Effektivität

### **2.3.3. Software „IRIS program version 2.343“**

Mit Hilfe der IRIS-Software erfolgte die Bedienung des Infrarotspektrometers. Sämtliche IRIS-Funktionen (Konfiguration, System, Kalibrierung, usw.) wurden über die Software gesteuert. So konnte beispielsweise unter dem Menüpunkt „Konfiguration“, individuell zum gewünschten Testlauf, die Probenzufuhr und Probenmessung den Erfordernissen entsprechend eingestellt werden.

Die Software diente außerdem der Speicherung und Auswertung aller Messdaten ( $\Delta$ -Permille, Delta over Baseline (DOB), kumulative Recovery (KUM), CO<sub>2</sub>-Konzentration, Zeitpunkt der Messung).

Die Berechnung der kumulativen Recovery erfolgte quantitativ als Fläche unter der Dosis/h Kurve (siehe Tabelle 2). Die Auswertung erfolgte in Form von Tabellen und Graphen.

<b>Dose/h [%<sup>13</sup>C] = A<sub>1</sub> / A<sub>2</sub> * 100</b>
<b>A<sub>1</sub> = [R / (R + 1) - R<sub>0</sub> / (R<sub>0</sub> + 1)] * P</b> <b>A<sub>2</sub> = [E / 100 - R<sub>0</sub> / (R<sub>0</sub> + 1)] * D</b>  R = <sup>13</sup> CO <sub>2</sub> / <sup>12</sup> CO <sub>2</sub> der Probe R <sub>0</sub> = <sup>13</sup> CO <sub>2</sub> / <sup>12</sup> CO <sub>2</sub> der Referenz (Messung ohne Substrat) E: isotopische Anreicherung (Substrat) in [%] P: CO <sub>2</sub> -Produktion der Maus in mmol/h*BSA (Body Surface Area s.u.)
<b>R = ( d / 1000 + 1) * R<sub>PDB</sub></b> <b>R<sub>0</sub> = ( d<sub>0</sub> / 1000 + 1) * R<sub>PDB</sub></b> d: Deltawert zum Zeitpunkt t > 0 in [‰] d <sub>0</sub> : Deltawert zum Zeitpunkt t = 0 in [‰] R <sub>PDB</sub> = 0,0112375
<b>P = 94 * w [g] * BSA</b> <b>BSA = 10,5 * w [kg]<sup>2/3</sup></b> (Body Surface Area) w: Körpergewicht (Maus)
<b>D = m * n / M</b> m: Dosis (Substrat) in [mg] n: <sup>13</sup> C-Atome pro Molekül (Substrat) M: Molekulargewicht (Substrat) in [g/mol]
<b>Cum.Dose (t<sub>i</sub>) [%<sup>13</sup>C] = ∑<sub>i</sub> [Dose/h (t<sub>i</sub>) + Dose/h (t<sub>i-1</sub>)] / 2 * (t<sub>i</sub> - t<sub>i-1</sub>) / 6</b>  t <sub>i</sub> : Probenzeit in [min]

Tabelle 2: Berechnung der kumulative Recovery

#### **2.3.4. Konfiguration der IRIS DOC-Soft, Infra Red Isotype Analyzer**

Die Konfiguration diente der Steuerung von Probenzufuhr und -messung durch das Infrarotspektrometer. Im Einzelnen konnten folgende Parameter in der Konfigurationsoberfläche eingestellt werden:

„Akkumulationszeit“, „Einlasszeit“, „Wartezeit“ und „Messung“ (Abbildung 6).

#### **2.3.5. Akkumulationszeit**

Während der Akkumulationszeit wurde der kontinuierliche Gasfluss in einem der 4 Atemtest-Käfige unterbrochen und es kam zur Anhäufung von CO<sub>2</sub>. Je länger die Akkumulationszeit war, desto höher stieg die CO<sub>2</sub>-Konzentration an. Alle anderen Käfige wurden währenddessen durch den regulierten Zustrom CO<sub>2</sub>-freier Druckluft durchspült. Die Pumpe des Analysators spülte gleichzeitig die Messeinheit (Totraum und Messzelle) mit Raumluft (vgl. Spülzeit).

#### **2.3.6. Einlasszeit**

In der Einlasszeit wurde die während der Akkumulationszeit im Käfig angesammelte Atemluft durch den regulierten Zustrom von CO<sub>2</sub>-freier Druckluft in das Analysegerät transportiert. Je länger die Einlasszeit bzw. je größer der regulierte Gaszustrom war, desto größer war die in das Gerät transportierte Luftsäule.

#### **2.3.7. Wartezeit**

Während der Wartezeit wurde die Atemprobe durch die Pumpe des Analysegerätes mit dem Gas in der Messeinheit des Analysators (Totraum plus Messzelle) gemischt. Der Käfig wurde weiterhin mit CO<sub>2</sub>-freier Druckluft durchströmt, die nunmehr jedoch – wie zuvor bereits bei allen anderen Käfigen - in die Umluft abgegeben wurde.

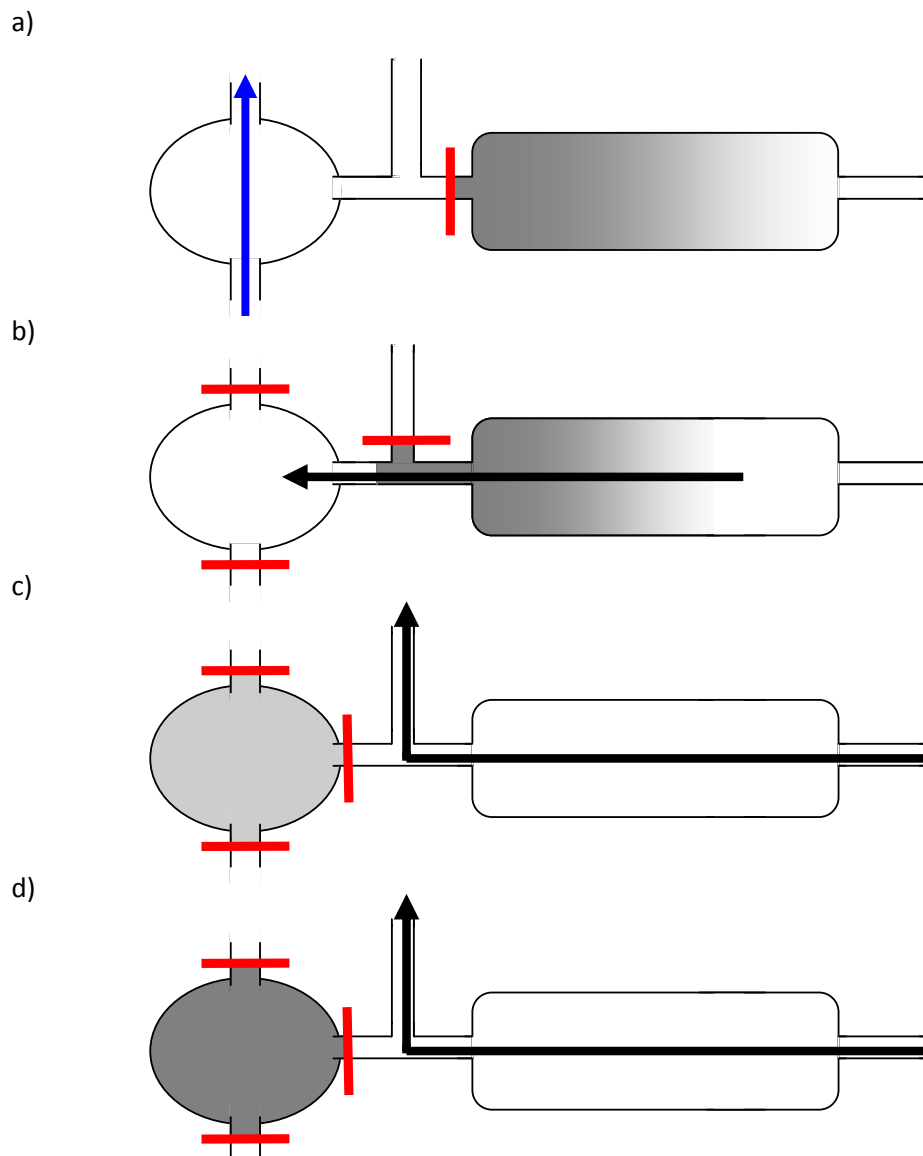


Abbildung 6: Messvorgang / IRIS-Konfiguration

Dargestellt sind die einzelnen Schritte, die bei der Probenzufuhr und -messung durch das Infrarotspektrometer ablaufen: a) Akkumulationszeit, b) Einlasszeit, c) Wartezeit, d) Messung. Grau-schwarze Fläche: Atemprobe, Blauer Pfeil: Spülung der IRIS-Messeinheit. Schwarzer Pfeil: CO<sub>2</sub>-freie Druckluft, Roter Balken: verschlossenes Ventil; [Zsifkovits, 2007]

### 2.3.8. Messung

Die „eigentliche“ Messung der Atemprobe setzte sich aus mehreren Einzelmessungen zusammen. Die Dauer einer Einzelmessung betrug 1 Sekunde, folglich entsprach die

Gesamtdauer der Messung der Summe der Einzelmessungen. Das Infrarotspektrometer berechnete den Mittelwert der Einzelmessungen.

### 2.3.9. Spülzeit (IRIS)

Die Spülzeit diente dem Herauswaschen des verbliebenen CO<sub>2</sub> aus der Messeinheit (Totraum plus Messzelle). Die Pumpe des Gerätes spülte hierzu Raumluft durch das System. Die Spülzeit umfasste den Zeitraum zwischen dem Ende einer Messung (z.B. Messung 1 in Käfig 1) und dem Beginn der Einlasszeit der darauf folgenden Messung (z.B. Messung 1 in Käfig 2). Sie lief somit zeitgleich mit der Akkumulationszeit ab. Die Dauer der eingestellten Spülzeit entsprach mindestens der Akkumulationszeit. Wurde die Spülzeit verlängert, so verlängerte sich der Abstand zweier aufeinander folgender Messungen ohne Veränderung der Akkumulationszeit.

Folgende Einstellungen der IRIS-Konfiguration erfüllten unsere Anforderungen am besten:

Akkumulationszeit	57 Sekunden
Einlasszeit	6 Sekunden
Wartezeit	18 Sekunden
Spülzeit	57 Sekunden
Messung	15 Sekunden
Gesamtdauer für Messung eines Datenpunktes	96 Sekunden

*Tabelle 3: IRIS-Konfiguration*

Mit einer Akkumulationszeit von 57 Sekunden erreichten die CO<sub>2</sub>-Konzentration Werte zwischen 1 und 2,8%. Die große Schwankungsbreite erklärte sich durch die Abhängigkeit der CO<sub>2</sub>-Konzentration vom Aktivitätsgrad der Maus. Unmittelbar nach Tracerinjektion (Stresssituation) lagen die CO<sub>2</sub>-Konzentrationen deutlich höher als während Ruhephasen (Abbildung 7).

Bei der Einlasszeit hatte sich eine Dauer von 6 Sekunden als optimal erwiesen. Längere Einlasszeiten konnten zu einer Verdünnung der Probe mit CO<sub>2</sub>-freier Luft führen. Dies erkannte man daran, dass die Werte zu Beginn der Einlasszeit zwar anstiegen, in der weiteren Folge aber wieder stark abfielen. Bei zu kurz gewählter Einlasszeit gelangte ein zu

geringer Anteil der Atemprobe in die Messeinheit des Infrarotspektrometers, mit der Folge von ebenfalls zu geringen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen. Bei der Wartezeit und der Anzahl der Messpunkte wurden die von Wagner Analysen Technik GmbH empfohlenen Werte beibehalten. Die Dauer der Spülzeit von 57 Sekunden reichte aus, um innerhalb der IRIS-Messeinheit die CO<sub>2</sub>-Konzentration wieder auf Raumluftniveau zu senken.

Die Gesamtdauer für die Messung eines Datenpunktes pro Maus von 96 Sekunden ergab sich aus der Addition aller Teilzeiten der Messung, wobei die Akkumulationszeit als integraler Bestandteil der Spülzeit nicht gesondert berücksichtigt werden musste. Diese Gesamtdauer einer Messung (hier 96 Sekunden) legte den Abstand zwischen den Messungen bei aufeinander folgenden Käfigen (z.B. Messung 1 bei Käfig 1 und Messung 1 bei Käfig 2) fest. Erst wenn der letzte Käfig gemessen wurde (z.B. Messung 1 bei Käfig 6), konnte die nächste Messung bei Käfig 1 (hier Messung 2) erfolgen. Das bedeutete, dass die minimalen Messintervalle von der Gesamtdauer einer Messung und der Anzahl der simultan untersuchten Tiere determiniert wurden. Um kurze Messintervalle zu ermöglichen und damit eine hohe Datenpunktdichte zu erzielen, wurden die Untersuchungen mit 4 anstatt möglicher 6 Versuchstiere durchgeführt. Aus diesen Einstellungen resultierten somit Messintervalle von 384 Sekunden ( $= 96 \times 4$ , entsprach 6,4 Minuten pro Intervall). Bei einer Akkumulation von 57 Sekunden ergaben sich daraus 327 (384-57) Sekunden, in denen der Käfig mit CO<sub>2</sub>-freier Luft durchströmt wurde.

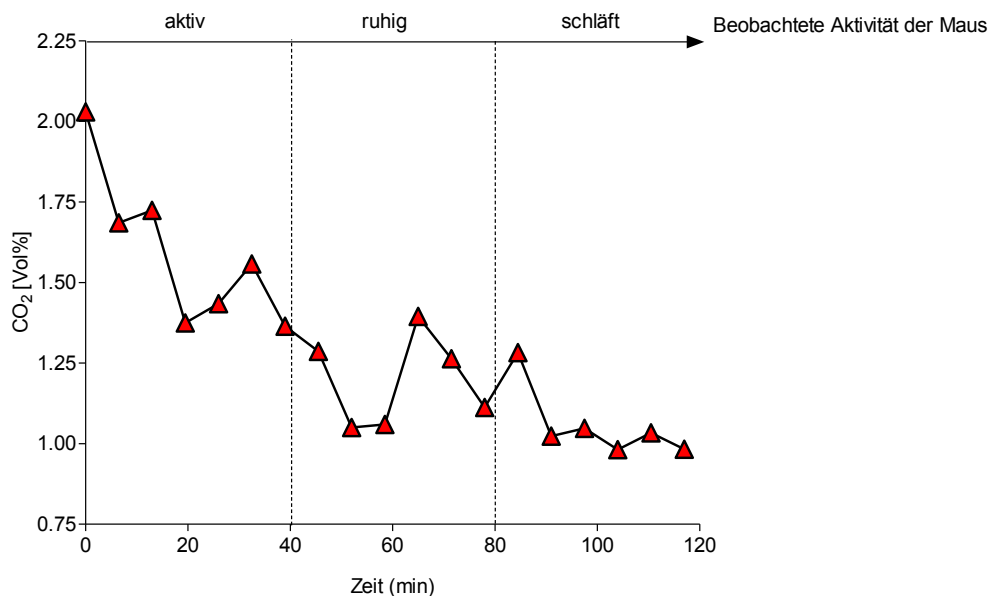


Abbildung 7: CO<sub>2</sub> Recovery

Dargestellt sind akkumulierte CO<sub>2</sub>-Werte in (Vol%) eines Versuchstieres. Zum Zeitpunkt 0 (= unmittelbar nach der Tracerinjektion) ist die Stresssituation der Maus anhand der höheren CO<sub>2</sub> Konzentration zu erkennen. Im Laufe des Versuches beruhigt sich das Tier bis zum Erreichen eines schlafähnlichen Zustandes, bei dem sich die CO<sub>2</sub>-Werte auf einem Wert um 1 Vol% einstellen.

### 2.3.10. Atemtestkäfige

Bei den Atemtestkäfigen handelte es sich um eigens dafür angefertigte Plexiglasröhren, welche beidseits mit einem Gummistopfen verschlossen wurden. Um optimale Messgenauigkeit zu gewährleisten, wurde das Volumen der Käfige auf 93 cm<sup>3</sup> festgelegt, da bei dieser Größe in allen Atemproben CO<sub>2</sub>-Konzentrationen von über 0,8% erreicht werden konnten.

In beiden Stopfen befand sich eine zentrale Öffnung für Anschlüsse, zum einen an das Messgerät, zum anderen an die Luftzufuhr. Mauseitig befand sich an den Stopfen jeweils eine Metallscheibe, die das Anknabbern des Gummistopfens verhinderte.

### 2.3.11. Filterung des Atemgases

Das Filtersystem bestand aus 4 Bestandteilen. Zunächst wurde die Pressluft durch Atemkalk (DiveSorb, Dräger Safety) geleitet. Das Kohlendioxid in der Pressluft wurde durch den Atemkalk gebunden. Anschließend wurde das Gas durch einen Wattefilter und destilliertes



Wasser geleitet. Watte und destilliertes Wasser reinitgen die Luft von Atemkalkstaub und feinsten Ölpartikeln aus dem Druckluftsystem. Um das Infrarotspektrometer vor Flüssigkeit zu schützen, befand sich vor dem Durchflussmesser ein hydrophober Filter (Vacushield Vent, Pall Gelmann).

#### **2.3.12. Regulation der Luftversorgung**

Die Regulation der Luftversorgung erfolgte mit einem Durchflussmesser (Kleindurchflussmesser Serie 10A6100, ABB Asea Brown Boveri Ltd). Für die kontinuierliche Versorgung mit Frischluft wurde ein Luftfluss (Flow) von 200 ml/min pro Maus gewählt [Symonds et al., 2000]. Folglich benötigten 4 Versuchstiere pro Atemtest einen Gesamt-Flow von 800 ml/min.

#### **2.3.13. Regulation der Umgebungstemperatur**

Um die Versuchstemperatur zu standardisieren, wurde eine spezielle Wärmeverrichtung konstruiert. Die Thermostatisierung der Versuchsröhren erfolgte mit Hilfe einer Klimakammer, die während der Versuchszeit mittels einer Pumpe mit temperiertem Wasser aus einem Wasserbad durchspült und erhitzt wurde. Zur kontinuierlichen Temperaturüberwachung wurde ein Thermostat eingesetzt. Um die Entstehung von Kondenswasser und somit die Beeinflussung der Messwerte aufgrund von Feuchtigkeit zu verhindern, sowie einem Auskühlen der Tiere entgegenzuwirken, konnten wir das Temperaturoptimum bei 29-30°C festlegen.

#### **2.3.14. Quantifizierung von Pterinen**

Um die verschiedenen Genotypen in Bezug auf die Menge, die Umsatzgeschwindigkeit und das Umsatzverhalten der Gesampterine (Biopterin, BH<sub>2</sub> und BH<sub>4</sub>) im Blut vor und nach einer BH<sub>4</sub>-Injektion zu untersuchen, führten wir einen Test zur Bestimmung der Kinetik der Pterine durch. Hierbei wurde den Tieren Blut aus der Schwanzspitze entnommen und auf Filterpapierkarten aufgebracht. Anschließend wurde den Tieren 20 mg/kg BH<sub>4</sub> i.p. injiziert und weitere Blutabnahmen wurden zu den Zeitpunkten 10, 20, 30, 60, 120, 180 Minuten nach der Injektion durchgeführt. Die Blutproben auf den Filterpapierkarten wurden anschliessend mittels HPLC quantifiziert. Um die variierende Menge Blutes auf den Filterkarten zu berücksichtigen, wurde in den Analysen zusätzlich die Hämoglobinmenge

mittels AHD - Methode bestimmt (siehe 2.4.5). Mit Hilfe dieses Versuches konnten nicht nur die Ausgangswerte ohne jegliche Behandlung oder die Maximalkonzentrationen nach BH<sub>4</sub> im Blut verglichen werden, sondern auch Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit der PAH mittels HWZ-Vergleich gezogen werden.

#### **2.3.15. HPLC Analyse**

Geräte: HP 1100

Säule: C8 Spherisorb, 5µm pre-column (40 x 4,6 mm)

ODS-1 Spherisorb, 5µm analytical column (250 x 4,6 mm) (Fa. Waters)

Laufmittel: 95% Phosphatpuffer, 5% Methanol

Filter: Disc-Filter, Fa. Millipore

Cat. Nr.: HVHP04700

Filterröhrchen: Microcon Ultracel YM-10 Fa. Millipore, Cat. Nr.: 42406

### **2.4. Allgemeiner Versuchsaufbau / Basisprotokoll**

#### **2.4.1. Haltung und Pflege der Tiere**

Die BTBR, *Pah*<sup>enu1</sup> und *Pah*<sup>enu2</sup> Mäuse wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen. Die compound heterozygoten Mäuse *Pah*<sup>enu1/2</sup> wurden an der Paracelsus medizinischen Privatuniversität (Salzburg) mittels Kreuzung gezeugt.

Die Tiere wurden unter kontrollierten Temperaturbedingungen sowie unter einem strikten hell/dunkel Rhythmus von jeweils 12 Stunden gehalten. Die Atemtests wurden ausschließlich mit 3 bis 6 Monate alten männlichen Mäusen durchgeführt. Zwischen den Versuchen erhielten die Mäuse Standardnahrung und befanden sich mit Mäusen des gleichen Genotyps in den Käfigen. Wasser war in jeder Phase des Experiments für die Mäuse zugänglich. Am Vorabend des Versuches (zur Vermeidung von Koprophagie und zur Sicherstellung der Nüchterphase), sowie zur Regeneration nach den Versuchen, wurden die Tiere vorübergehend in Einzelkäfigen gehalten.

Bluttests wurden ausschließlich mit Blutproben aus der Schwanzspitze der Mäuse durchgeführt (pro Probe ca 30-60 µl Blut).

Die Genehmigung zur Durchführung unserer Experimente erfolgte vom österreichischen Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung.

## **2.4.2. Vorbereitung**

### **2.4.2.1. Vorbereitung der Mäuse**

Um die Beeinflussung des Atemtest durch natürlich vorkommendes  $^{13}\text{C}$  in der Nahrung zu minimieren, wurden die Untersuchungen im Anschluss an eine Nüchternphase (*overnight fast*) von mindestens 12 Stunden durchgeführt [Hammond et al., 1999]. Während dieser Nüchternzeit erhielten die Tiere Wasser, aber kein Futter. Koprophagie wurde durch die Verwendung von hochgestellten Gitterböden vermieden. Zwischen zwei Atemtests lagen zur Schonung der Tiere mindestens 48 Stunden. An versuchsfreien Tagen erhielten die Mäuse ihre Standardnahrung. Um den Tieren die Möglichkeit zur Regeneration zu geben, wurden sie im Anschluss an den Test in Einzelkäfigen gehalten.

### **2.4.2.2. Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des Atemkalks**

Die Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Atemkalks erfolgte mit Hilfe des Infrarotspektrometers im Sinne eines Filterchecks. Um die  $\text{CO}_2$ -Konzentration des Atemgases zu messen, führte man eine IRIS-Messung ohne Maus durch. Am Ende der Wartezeit konnte die vorliegende  $\text{CO}_2$ -Konzentration des Atemgases ablesen werden. Da sich zunächst noch Raumluft im IRIS-System befand, musste die Messung mindestens dreimal wiederholt werden. Dabei dienten die ersten beiden Messvorgänge dazu, das System komplett mit Atemgas zu spülen. Bei frischem, funktionsfähigem Atemkalk erhielt man  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen von 0,001%. Als noch tolerablen Grenzwert wurde eine  $\text{CO}_2$ -Konzentration von 0,02% festgelegt. Wurde diese überschritten, musste der Atemkalk ausgetauscht werden.

### **2.4.3. Durchführung des Atemtestes**

Um verfälschte Nullwerte zu vermeiden (hohe  $\text{CO}_2$ -Werte aufgrund der Stresssituation), kamen die Mäuse nach Kalibration der IRIS und Filtercheck zur Gewöhnung ungefähr 30 Minuten in die Versuchskäfige. Anschließend wurden die Nullwerte (Ausgangswerte = 0-Werte) vor Verabreichung des Tracers gemessen. Nach Bestimmung der 0-Werte wurde die IRIS-Messung gestoppt. Es folgte die intraperitoneale Verabreichung des Tracers ( $^{13}\text{C}$ -Phe), wobei die Reihenfolge und der zeitliche Abstand der Injektionen mit den Messabständen zwischen den einzelnen Mäusen übereinstimmen mussten. Um den gleichen

zeitlichen Abstand zwischen den Injektionen und den folgenden Messzeitpunkten zu erhalten, wurde bei Standardbedingungen die zweite Maus ca. 100 Sekunden nach der ersten gespritzt und so fort.

Die Standarddosis des Tracers betrug 15 mg/kg KG. Nachdem die letzte Maus ihre Injektion erhalten hat und in ihren Versuchskäfig zurückgesetzt wurde, wurde die Messung fortgesetzt. Die gesamte Untersuchungszeit betrug 122 Minuten (6,4 Min x 19 Messpunkte) und beinhaltete (inklusive 0-Wert) 19 Messpunkte pro Maus.

#### **2.4.4. Durchführung der Blutabnahme**

Zur Herstellung von Trockenblutproben wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzspitze entnommen. Um die maximale Tagesmenge nicht zu überschreiten, wurde den Tieren bei einem Blutvolumen von 7-8 % des Körpergewichtes täglich maximal 1% des Blutvolumens (ca. 200 µl bei 25 g schwerer Maus) entnommen. Die Blutropfen wurden auf Filterpapierkarten (Filterpapierkarten für Neugeborenen-Screening) aufgetropft. Dabei wurde darauf geachtet, dass die auf den Filterpapier-Testkarten gekennzeichneten Kreise vollständig mit Blut durchtränkt waren. Nach Trocknen der Testkarten bei Raumtemperatur wurden diese an ein spezialisiertes Labor geschickt und die Phenylalaninkonzentrationen im Blut der Mäuse bestimmt.

#### **2.4.5. Weiterverarbeitung der Blutproben und Normalisierung auf Hämoglobin**

Da zwischen Blutabnahme und Bearbeitung der Proben mittels HPLC die Blutproben auf den Filterkarten in Raumluft bereits zu oxidieren begannen und der Oxidationsstatus zum späteren Zeitpunkt der Weiterverarbeitung nicht berücksichtigt werden konnte, wurden die Proben vor der Verarbeitung vollständig zur Oxidation gebracht. Um die variierende Menge Blutes auf den Filterkarten zu berücksichtigen, wurde in den Analysen zusätzlich die Hämoglobinmenge mittels AHD - Methode bestimmt. Die AHD-Methode (Alkalisches-Hämatin-Detergens-Methode) diente der quantitativen Hämoglobinbestimmung. Das eingesetzte Reagens (2,5% Triton X-100 (Sigma) in 0,1 mol/l Natronlauge; pH = ~13) bildete mit Hämoglobin sowie seinen Varianten einen farbigen Komplex, der photometrisch (HITACHI Model U-2000;  $\lambda$  = 574; Programm 19) detektiert wurde. Die Farbintensität des Komplexes war proportional zur Hämoglobin-Gesamtkonzentration in der untersuchten Probe. Somit konnte die Menge der Pterine in Bezug auf die tatsächliche Menge des Blutes

auf der Testkarte gesetzt werden. Zur Kalibration wurde als Standardsubstanz Chlorhäm in der Firma Roth verwendet.

#### **2.4.6. Vorbereitung der Proben für die HPLC-Analyse**

##### **2.4.6.1. Pterin Kinetik**

Zur Weiterverarbeitung wurden jeweils gleich große Probenstücke aus den Filterkarten geschnitten (12 mm Durchmesser) und anschließend in 1,5 ml Reagenzröhrchen gefüllt. Die mit 20 mmol/l Extraktionslösung Chlorwasserstoff und den Proben gefüllten Röhrchen wurden für eine Minute in ein Ultraschallbad gestellt und zur weiteren Extraktion für 10 Minuten bei Raumtemperatur 5 mal für 5 Sekunden gevortext. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1800 g, wurden 50 µl des klaren Überstandes für die oben erwähnte Hämoglobinanalyse abpipettiert. Weitere 475 µl des verbliebenen Überstandes wurden zusammen mit 25 µl des internen Standards (Rhamnopterin 100 nmol) in einem Filterröhrchen bei 5000 g für 25 Minuten zentrifugiert.

Für die Kinetik der Pterine wurden 25 µl Injektionsvolumen des klaren Filtrats nun mittels HPLC (siehe 2.4.6.2) und Fluoreszenzdetektion analysiert. Der Fluoreszenzdetektor (Excitationswellenlänge 273 nm, Emissionswellenlänge 443 nm) arbeitete nach dem Prinzip der Emissionsmessung. Es wurde keine Differenz zwischen zwei Lichtintensitäten gemessen, sondern eine emittierte Strahlung. Die Probe wurde in der Durchflussmesszelle mit UV-Strahlung einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt. Fluoreszierende Verbindungen wie Biopterin absorbieren das eingestrahlte Licht und emittieren unmittelbar ein längerwelliges. Das in alle Richtungen emittierte Licht der Probe wurde lediglich senkrecht zur Einstrahlungsrichtung gemessen, um zu verhindern, dass das Anregungslicht auf die Photomesszelle (Photomultiplier) fiel.

##### **2.4.6.2. HPLC, High Performance Liquid Chromatography**

Die HPLC - *High-Performance Liquid-Chromatography* - ist ein Verfahren der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie. Sie stellt ein Trennverfahren dar, bei dem die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert wird.

Je nach Art der Wechselwirkung zwischen stationärer Phase, mobiler Phase und Probe unterscheidet man in der Flüssigkeitschromatographie folgende Trennmechanismen: Adsorptions-, Ionenaustausch-, Ausschluss- und Affinitätschromatographie.

In unserem Fall wurde die Adsorptionschromatographie angewandt, bei der die Probenmoleküle durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen reversibel an die stationäre Phase gebunden werden. Die Verweildauer der Substanzen an der stationären Phase war aufgrund der unterschiedlich starken Wechselwirkung mit der Oberfläche der stationären Phase unterschiedlich lang. So wurden die Probesubstanzen voneinander getrennt [Schwedt; 1996]. Die Quantifizierung der Probenbestandteile erfolgte unmittelbar nach der Säule durch Detektoren, welche ein Signal erzeugten sobald eine Probensubstanz erschien. Die Signale wurden in einem Chromatogramm registriert.

#### **2.4.6.3. IRIS, Infrared Isotype Analyzer**

Der Infrarot-Isotopen-Analysator quantifiziert das Verhältnis der  $\text{CO}_2$ -Isotope  $^{13}\text{CO}_2$  und  $^{12}\text{CO}_2$ . Das zugrunde liegende Funktionsprinzip heißt nicht-dispersive, isotopenselektive Infrarotspektroskopie (NDIRS). Hierbei wird auf disperse Medien wie Gitter oder Prismen verzichtet. Es kommen eine breitbandige Lichtquelle und ein akustooptischer Detektor zum Einsatz, der nur auf die Wellenlängen anspricht, bei denen das zu messende Gas absorbiert wird. Der akustooptische Detektor besteht aus einer Gaszelle, angefüllt mit dem Gas, welches nachgewiesen werden soll, und einem Kondensatormikrophon. Ändert sich der Druck in der Gaszelle durch Erwärmung nach Absorption von Anteilen des Lichtes durch das Gas, so ändert sich die Kapazität des Kondensatormikrophons. Entscheidend ist dabei, dass nur die Wellenlängen zu Druckschwankungen führen, bei denen das Gas im Detektor absorbiert wird. Befindet sich in der Messzelle zwischen Lichtquelle und Detektor eine bestimmte Konzentration des Gases, mit dem der Detektor gefüllt ist, kann die Konzentration aus der Amplitude der Druckschwankungen in der Detektorzelle bestimmt werden. Die Amplitude der Druckschwankungen ist proportional zur Transmission und umgekehrt proportional zur Gaskonzentration der Messzelle. Die Selektivität des Spektrometers wird also durch Füllung der Detektorzelle erreicht. Die NDIRS zur Konzentrationsbestimmung von  $^{13}\text{CO}_2$  und  $^{12}\text{CO}_2$  beruht darauf, dass die Absorptionsspektren bei  $4,3\text{ }\mu\text{m}$  beider Moleküle fast vollständig getrennt sind und deshalb Interferenzen, die die Konzentrationsbestimmung beeinträchtigen könnten, sehr klein sind.

Um diese Interferenzen weiter zu reduzieren, werden je zwei Referenz- und Messgaszellen eingesetzt. Das IRIS-Gerät besitzt zwei Infrarot-Kanäle. In dem ersten Infrarot-Kanal wird ein Messbereich von 0-500 ppm  $^{13}\text{CO}_2$  und im zweiten Infrarot-Kanal ein Messbereich von 0-5 Volumenprozent  $^{12}\text{CO}_2$  erfasst.

Um die Restempfindlichkeit zwischen  $^{13}\text{CO}_2$  und  $^{12}\text{CO}_2$  zu verbessern, wird eine Filterzelle für den  $^{13}\text{CO}_2$ -Kanal, die mit reinem  $^{12}\text{CO}_2$  gefüllt ist, verwendet. Diese Filterzelle blockiert fast vollständig alle interferierenden Wellenlängen. Damit kann mit Hilfe des IRIS-Gerätes die Ratio von  $^{13}\text{CO}_2$  und  $^{12}\text{CO}_2$  mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,2 \text{ ‰}$  (Promille) innerhalb eines  $\text{CO}_2$ -Konzentrationsbereichs von 0,5 bis 5 Volumenprozent gemessen werden.

#### **2.4.7. Optimierung des Untersuchungsintervalls**

Bei Betrachtung des Kurvenverlaufs der fraktionierten Recovery über die Zeit konnte Zifkovits [Zifkovits, 2007] zeigen, dass sämtliche Kurven bereits nach 100 Minuten basale DOB-Werte erreichten, um die sie in weiterer Folge schwankten. Daher begrenzten wir die Untersuchungszeit zur Schonung der Versuchstiere auf 124 Minuten (19 Messpunkte inklusive 0-Wert).

### **2.5. Statistische Auswertung**

Alle Messergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM (Standard Error of the Mean) angegeben. Beim Vergleich von verbundenen Gruppen wurde ein zweiseitiger Student's t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt. Bei unverbundenen Gruppen kam der zweiseitige, ungepaarte Student's t-Test zu Anwendung. Signifikanzniveaus von  $p < 0,05$  wurden als signifikant, Signifikanzniveaus von  $p < 0,001$  als hochsignifikant bezeichnet.

#### **2.5.1. Regression**

In der folgenden statistischen Auswertung wurden die Halbwertszeiten für die Pterin-Kinetik mittels nichtlinearer Regression bestimmt. Dabei wurde eine Bateman-Funktion so angewandt, dass die Summe der quadrierten Abstände der Daten zur Funktion minimal war (*least squares fit*). Die ermittelte Funktion bezeichnet man auch als Regressionskurve.

### 2.5.2. Bestimmung der Halbwertszeiten

Als Halbwertszeit (HWZ) wird hier die inverse Eliminationskonstante in der Bateman-Funktion bezeichnet. Die Bateman-Funktion beschreibt den Verlauf einer Konzentration eines Wirkstoffes bei gleichzeitiger Invasion und Elimination in einem Kompartiment. Für eine maximale Konzentration  $c > 0$  und Invasions- und Eliminationskonstanten  $K_I > 0$  und  $K_E > 0$  lautet die Bateman-Funktion:

$$c(t) = \frac{c K_I}{K_E - K_I} (e^{-K_I t} - e^{-K_E t})$$

Hier bezeichnet  $c(t)$  die Konzentration der Pterine im Blut zum Zeitpunkt  $t$ . Die Parameter  $c$ ,  $K_I$ ,  $K_E$  wurden durch nichtlineare Regression so bestimmt, dass die quadrierten Abstände der entsprechenden Kurve zu den approximierten Daten minimal waren. Vor der Regression berechneten wir für jeden Messzeitpunkt die Mittelwerte einer Versuchsreihe. Dann normalisierten wir die Daten so, dass der Mittelwert der ersten Messung 0% der Konzentration und der maximale Mittelwert 100% der Konzentration entsprachen.

Dies stellte sicher, dass die berechneten Werte unabhängig von der Höhe des endogenen Ausgangswertes waren. Für die Berechnung der nichtlinearen Regression legten wir 1000 als maximalen Wert für  $c$  fest, um das verwendete Optimierungsverfahren zu stabilisieren. Die HWZ der Konzentration berechnete sich dann aus der ermittelten Eliminationskonstante nach

$$\text{HWZ} = \frac{\ln(2)}{K_E}.$$



### 3. Ergebnisse

Zur Vereinfachung verwenden wir in diesem Abschnitt folgende Konventionen: HZE1 entspricht heterozygot  $Pah^{enu1}$ , HZE2 entspricht heterozygot  $Pah^{enu2}$ , ENU1 entspricht  $Pah^{enu1}$ , ENU1/2  $Pah^{enu1/2}$  und ENU2  $Pah^{enu2}$ .

#### 3.1. $Pah^{enu1}$ und $Pah^{enu2}$ als Modelle für die humane BH<sub>4</sub>-sensitive PKU

##### 3.1.1. Charakterisierung PAH-defizienter und korrespondierender Wildtypmäuse

###### 3.1.1.1. Phenylalaninkonzentrationen im Blut

Um die Unterschiede in der Enzymaktivität auf Metabolitebene darzustellen, wurde die basale Phenylalaninkonzentration im Blut bestimmt (Abbildung 8).

Korrespondierend zur höchsten Phenylalaninoxidation wiesen gesunde BTBR-Mäuse ( $n = 14$ ) den niedrigsten Blut-Phenylalaninwert von  $76,2 \pm 3,1 \mu\text{mol/l}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM) auf. Heterozygote Tiere zeigten Phenylalaninkonzentrationen von  $80,0 \pm 3,7 \mu\text{mol/l}$  bei HZE1 ( $n = 9$ ;  $p = 0,44$ ) und  $82,6 \pm 3,9 \mu\text{mol/l}$  bei HZE2 ( $n = 5$ ;  $p = 0,27$ ) nicht signifikant höher. Die Phenylalaninwerte im Blut bei ENU1 ( $n = 18$ ) lagen über BTBR Niveau bei durchschnittlich  $172,3 \pm 6,1 \mu\text{mol/l}$  gefolgt von ENU1/2 ( $n = 20$ ) mit  $188,0 \pm 7,2 \mu\text{mol/l}$  und ENU2 ( $n = 4$ ) mit  $1144,0 \pm 70,7 \mu\text{mol/l}$ .

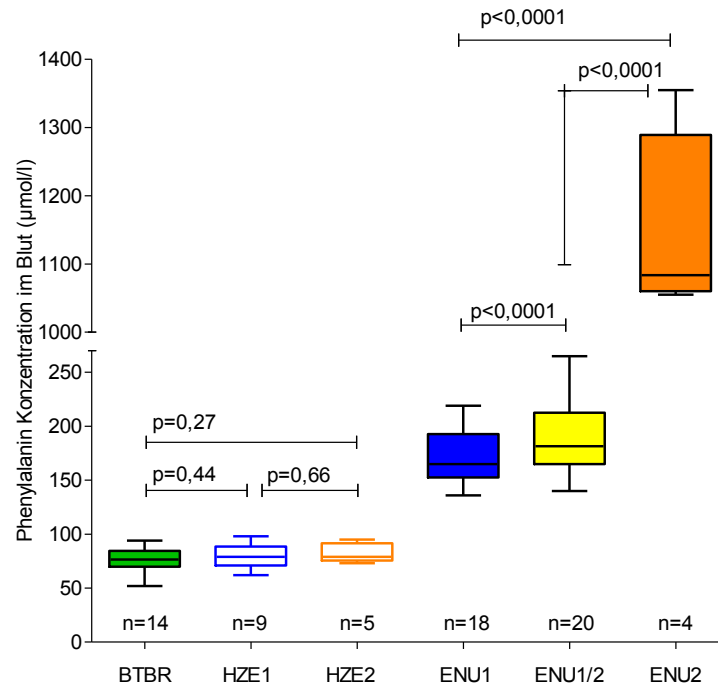


Abbildung 8: Phenylalaninkonzentrationen im Blut

Dargestellt sind die Phenylalaninkonzentrationen im Blut der Mäuse mit unterschiedlichen Genotypen ohne Behandlung.

### 3.1.1.2. Phenylalaninoxidation *in vivo*

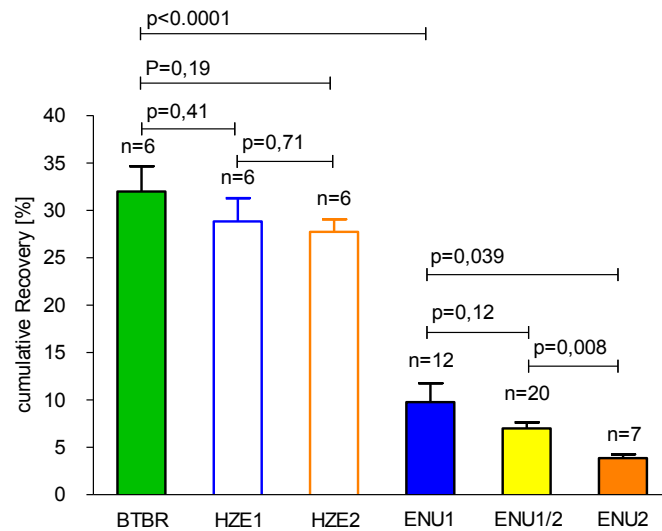
Zunächst wurde die basale Phenylalaninoxidation *in vivo* nach Verabreichung von 15 mg/kg markiertem  $^{13}\text{C}$ -Phenylalanin (= Tracer) mit Hilfe des Atemtestes bestimmt. Die kumulative Recovery von  $^{13}\text{C}$ -Phenylalanin entspricht der PAH Aktivität (Abbildung 9).

Die kumulative Recovery von BTBR (n = 6) lag nach 104 Minuten bei  $32,0 \pm 2,7 \%$  (Abbildung 9). Die Kurve zeigte zwischen 6 und 20 Minuten den steilsten Anstieg (Abbildung 10). Durchschnittlich wurden 90% der maximalen Recovery nach 51,5 Minuten erreicht.

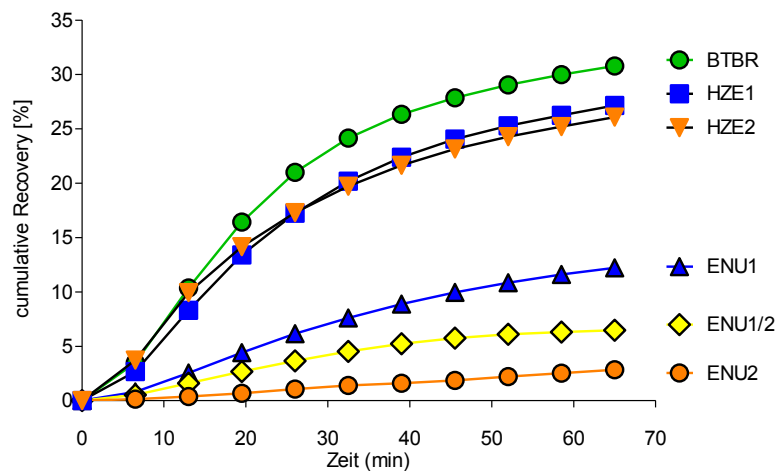
HZE1 und HZE2 lagen nur wenig unter BTBR Niveau. HZE1 (n = 6) kam durchschnittlich nach 104 Minuten auf eine kumulative Recovery von  $28,8 \pm 2,5 \%$  und HZE2 (n = 6) auf  $27,7 \pm 1,3 \%$  (Abbildung 9). Die Kurven verliefen annähernd deckungsgleich und zeigten zwischen 6 und 20 Minuten den steilsten Anstieg. Durchschnittlich wurden 90% der maximalen Recovery sowohl bei HZE1 als auch bei HZE2 nach 55 Minuten erreicht.

Unter den PAH-defizienten Mäuse zeigten ENU1 (n = 12) die höchste kumulative Recovery von  $9,8 \pm 2,0 \%$  gefolgt von ENU1/2 (n = 20) mit  $7,0 \pm 0,6 \%$  und ENU2 (n = 7) mit  $3,9 \pm 0,4 \%$

(Abbildung 9). Die Kurven von ENU1 und ENU1/2 zeigten noch ein Erreichen eines Plateaus nach anfänglichem Kurvenanstieg, wohingegen die Kurve von ENU2 bis zum Testende einen kontinuierlichen Anstieg der kumulativen Recovery, ohne Erreichen eines Plateaus, aufwies (Abbildung 10).



**Abbildung 9:** *In vivo* Phenylalaninoxidation in Wildtyp und PAH-defizienten Mäusen  
Dargestellt ist die basale Phenylalaninoxidation der verschiedenen Genotypen.



**Abbildung 10:** Kumulative Recovery nach Verabreichung von Placebo

Dargestellt ist die PAH-Aktivität über die Zeit nach Verabreichung von  $^{13}\text{C}$ -Phenylalanin als Tracer.

Zusammenfassend konnten die unterschiedlichen Genotypen HZE1, HZE2, ENU1, ENU1/2, ENU2 und die korrespondierenden Wildtyptiere (BTBR) anhand ihrer kumulativen Recovery nach 104 Minuten diskriminiert werden. Dabei lag die Oxidationsrate bei PAH-defizienten Mäusen signifikant unter der von Wildtypmäusen. Auch innerhalb der PAH-defizienten Mäuse konnte durch Bestimmung der kumulativen Recovery eine eindeutige Aussage bezüglich der Aktivität der Phenylalaninhydroxylase getroffen werden. Die Phenylalaninkonzentrationen im Blut spiegelten die Ergebnisse der Atemtests wider und unterstützen die Charakterisierung PAH-defizienter und korrespondierender Wildtyptiere.

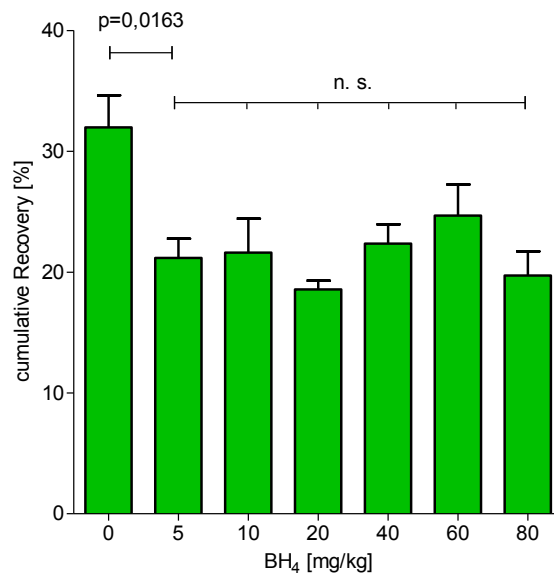
### **3.1.2. Charakterisierung pharmakologischer Effekte von BH<sub>4</sub>**

#### **3.1.2.1. Untersuchung der Regulation durch Substrat und Kofaktor im Wildtyp**

Um zu prüfen, ob BH<sub>4</sub> in unserem Modell - wie beim Menschen – einerseits inhibitorisch wirkt, andererseits die PAH-Aktivität bei Vorliegen von Mutationen erhöht, wurde die Phenylalaninoxidation nach Placebo und nach unterschiedlichen Dosierungen von BH<sub>4</sub> bestimmt.

##### **3.1.2.1.1. Untersuchung des Effektes des Kofaktors BH<sub>4</sub> auf die PAH-Aktivität im Wildtyp**

Nach Verabreichung von Placebo erreichten die BTBR-Mäuse eine kumulative Recovery von  $32,0 \pm 2,7 \%$ ;  $n = 6$  (Abbildung 11). Nach Verabreichung von 5 mg/kg BH<sub>4</sub> sank die kumulative Recovery signifikant auf  $21,2 \pm 1,6 \%$ ;  $n = 4$ . Nach Gabe von 10 mg/kg BH<sub>4</sub> erreichten die Tiere Werte von  $21,6 \pm 2,8 \%$ ;  $n = 4$ , von 20 mg/kg  $18,6 \pm 0,7 \%$ ;  $n = 4$ , von 40 mg/kg  $22,4 \pm 1,6 \%$ ;  $n = 4$ , von 60 mg/kg  $24,7 \pm 2,6 \%$ ;  $n = 4$  und von 80 mg/kg BH<sub>4</sub>  $19,7 \pm 2,0 \%$ ;  $n = 3$  für die kumulative Recovery. Mit BH<sub>4</sub> behandelte BTBR Mäuse zeigten somit eine signifikant niedrigere kumulative Recovery im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Hiermit konnte bestätigt werden, dass BH<sub>4</sub> wie beim Menschen inhibierend auf die Wildtyp-PAH wirkt. Es konnte zwischen 5 und 80 mg/kg BH<sub>4</sub> kein Dosiseffekt gezeigt werden (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Inhibitorischer Effekt von BH<sub>4</sub> in BTBR

Abgebildet sind der inhibitorische Effekt von BH<sub>4</sub> im Vergleich zur Placebobehandlung in BTBR sowie der fehlende Dosisseffekt. Dabei unterschied sich die kumulative Recovery der unbehandelten BTBR signifikant von den mit BH<sub>4</sub> behandelten Tieren. Innerhalb der mit unterschiedlichen Dosierungen behandelten BTBR Tiere zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

### **3.1.2.1.2. Untersuchung des Effektes des Substrates Phenylalanin auf die PAH-Aktivität im Wildtyp**

Um zu testen, ob Phenylalanin einen positiven Effekt auf die PAH zeigt, wurde den Tieren zunächst 500 mg/kg Phenylalanin, dann verschiedene BH<sub>4</sub>-Dosierungen verabreicht. Nach Phenylalaninbelastung (Abbildung 12) mit 500 mg/kg lag die kumulative Recovery von BH<sub>4</sub>-behandelten Tieren (10 mg/kg; n = 4) mit  $62,8 \pm 6,5 \%$  signifikant ( $p = 0,001$ ) über der von placebobehandelten Tieren ( $32,0 \pm 2,7 \%$ ). Mit einer Phenylalaninbelastung und 20 mg/kg BH<sub>4</sub> erreichten BTBR (n = 3) eine kumulative Recovery von  $58,8 \pm 6,0 \%$ , mit 40 mg/kg (n = 7) eine kumulative Recovery von  $62,4 \pm 4,1 \%$ , mit 60 mg/kg (n = 4) eine kumulative Recovery von  $62,4 \pm 5,7 \%$  und mit 80 mg/kg (n = 4) eine kumulative Recovery von  $64,0 \pm 4,3 \%$ .

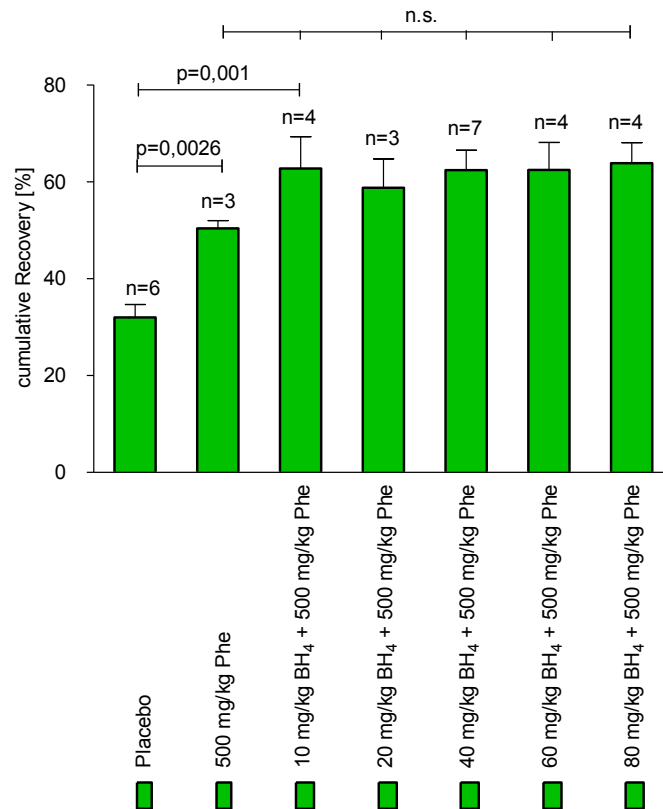


Abbildung 12: BH<sub>4</sub> Dosis-Effekte nach Phenylalanin-Load (500 mg/kg) in Wildtyp Mäusen (BTBR)

Dargestellt sind die verschiedenen BH<sub>4</sub>-Dosierungen mit Phe-Load im Vergleich zu Placebo. Es zeigte sich kein Dosisseffekt zwischen den BH<sub>4</sub>-Dosierungen.

Zusammenfassend führte BH<sub>4</sub> als Monotherapie in BTBR zu einer signifikant verringerten kumulativen Recovery und wirkte sich somit negativ auf die Phenylalaninoxidation *in vivo* aus. Zusätzlich lies sich kein Dosis-Wirkungs-Zusammenhang für die unterschiedlichen BH<sub>4</sub>-Konzentrationen feststellen.

Ein Phenylalanin-Load alleine steigerte signifikant die Phenylalaninoxidation im Vergleich zu Placeboversuchen. Der aktivierende Effekt des Substrates Phenylalanin auf die PAH-Aktivität ist gut bekannt. Zusammen mit BH<sub>4</sub> konnte keine weitere signifikante Steigerung der Phenylalaninoxidation bei der Wildtypmaus erzielt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es zwischen den BH<sub>4</sub> Konzentrationen keinen Dosisseffekt gibt und auch hohe Mengen von verabreichtem BH<sub>4</sub> keinen dosisabhängigen inhibitorischen Effekt zeigten.

### **3.1.2.2. BH<sub>4</sub>-Effekt in PAH-defizienten Tieren**

#### **3.1.2.2.1. ENU1 und ENU1/2**

Zur Untersuchung des BH<sub>4</sub> Dosiseffektes in ENU1 (Abbildung 13) und ENU1/2 (Abbildung 14), wurde den Tieren BH<sub>4</sub> in den Dosierungen 5, 10, 20, 30 und 40 mg/kg i.p. injiziert und anschließend der Atemtest durchgeführt.

Wir konnten in beiden Fällen eine Steigerung der Phenylalaninoxidation unter steigender BH<sub>4</sub>-Dosis beobachten. In ENU1 führten steigende BH<sub>4</sub> Dosierungen zu einer Sättigung ohne Eintreten eines inhibitorischen Effektes unter BH<sub>4</sub>. Die höchste kumulative Recovery von  $30,6 \pm 4,6 \%$  in ENU1 ( $n = 3$ ) stellte sich bei einer Dosierung von 30 mg/kg BH<sub>4</sub> ( $n = 2$ ) ein. Nach Gabe von 40 mg/kg ( $n = 8$ ) wurde eine kumulative Recovery von  $29,2 \pm 2,3 \%$  erzielt. Unter 20 mg/kg wurden  $28,9 \pm 3,2 \%$  ( $n = 9$ ), unter 10 mg/kg  $27,2 \pm 5,3 \%$  ( $n = 3$ ) und unter 5 mg/kg eine kumulative Recovery von  $19,0 \pm 3,0 \%$  ( $n = 3$ ) erreicht.

In ENU1/2 zeigte sich im oberen Dosisbereich (ab 30 mg/kg BH<sub>4</sub>) ein inhibitorischer Dosiseffekt durch BH<sub>4</sub> im Sinne einer Abnahme der Phenylalaninoxidation im Vergleich zu niedrigeren BH<sub>4</sub>-Dosierungen. In ENU1/2 wurde die höchste kumulative Recovery von  $42,8 \pm 8,2 \%$  bei einer Dosierung von 10 mg/kg BH<sub>4</sub> erzielt. Bei 20 mg/kg ( $n = 10$ ) lag die kumulative Recovery bei  $37,7 \pm 2,6 \%$ . Bei 30 mg/kg lag die kumulative Recovery bei  $26,5 \pm 2,8 \%$  ( $n = 3$ ), bei 40 mg/kg bei  $27,5 \pm 2,1 \%$  ( $n = 9$ ) und bei 5 mg/kg bei  $29,5 \pm 6,1 \%$  ( $n = 3$ ).

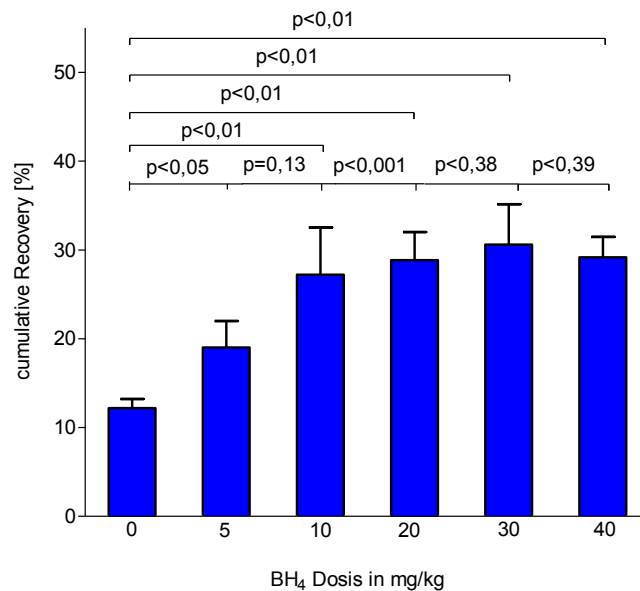


Abbildung 13: BH<sub>4</sub>-Effekt in ENU1

Dargestellt ist der Effekt von BH<sub>4</sub> in ENU1 mit einem positiven Dosiseffekt im Bereich von 20 mg/kg und dem Erreichen eines Plateaus bei höheren Dosierungen.

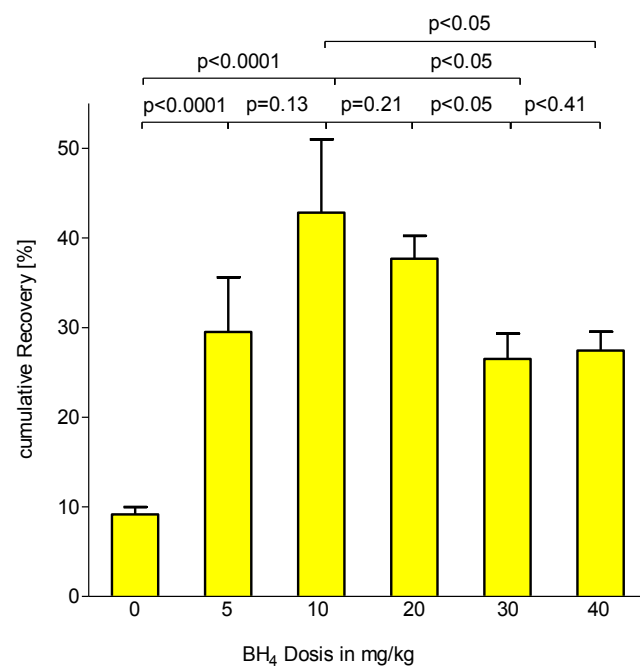


Abbildung 14: BH<sub>4</sub>-Effekt in ENU1/2

Dargestellt ist der Effekt von BH<sub>4</sub> in ENU1/2 mit einem positiven Dosiseffekt im Bereich von 20 mg/kg und einer suboptimalen Phe-Oxidation im höheren Konzentrationsbereich.



Zusammenfassend zeigte sich sowohl bei ENU1 als auch bei ENU1/2 eine dosisabhängige signifikante Steigerung der *in vivo*  $^{13}\text{C}$ -Phe Oxidation durch  $\text{BH}_4$  mit einem maximalen therapeutischen Effekt zwischen 10 und 30 mg/kg. Höhere Dosierungen (40 mg/kg) oder niedrigere Dosierungen (10 oder 5 mg/kg) erwiesen sich als weniger wirksam. Im Falle von ENU1/2 führten höhere Dosierungen zu einer erneuten Abnahme der Phenylalaninoxidation, sodass wir aufgrund dieser Ergebnisse alle weiteren Untersuchungen mit  $\text{BH}_4$  an ENU1 und ENU1/2 mit 20 mg/kg  $\text{BH}_4$  durchführten. Hierbei handelt es sich auch um die beim Menschen standardmäßig angewandte Dosis.

#### **3.1.2.2.2. Phenylalanin-Clearance in ENU1 und ENU1/2**

Um den  $\text{BH}_4$ -Effekt auf die Phenylalaninkonzentration im Blut, im Sinne einer Phenylalanineliminierung, zu untersuchen und somit eine indirekte Aussage über das Maß der PAH-Enzymaktivität zu treffen, wurde den Tieren Blut aus der Schwanzspitze zum Zeitpunkt 0 (= vor der Injektion) und zu den Zeitpunkten 20, 40, 60 und 120 Minuten nach der Injektion von 20 mg/kg  $\text{BH}_4$  + 15 mg/kg Phenylalanin entnommen. Placebotiere erhielten 15 mg/kg Phenylalanin (Abbildung 15).

Innerhalb der ersten 20 Minuten nach der  $\text{BH}_4$ -Injektion stieg die Phenylalaninkonzentration im Blut bei ENU1 von einem 0-Wert von 120,7  $\mu\text{M}$  auf einen Wert von 189,6  $\mu\text{M}$  an, um dann kontinuierlich bis zum Zeitpunkt 180 Minuten auf BTBR-Niveau zu fallen (61,6  $\mu\text{M}$  bei 180 Min.). ENU1 mit ausschließlich 15 mg/kg Phenylalanin im Sinne eines Placeboversuches, zeigten innerhalb der ersten 20 Minuten ebenfalls einen Anstieg auf 173,4  $\mu\text{M}$ , pendelten sich anschließend auf diesem Niveau ein und zeigten im Verlauf keinen weiteren Anstieg oder Abfall der Phenylalaninkonzentration im Blut.

ENU1/2 zeigten einen sehr ähnlichen Verlauf mit einem initialen Anstieg innerhalb der ersten 20 Minuten nach  $\text{BH}_4$  Injektion von 174,9  $\mu\text{M}$  auf 212,3  $\mu\text{M}$ . Der anschliessende Abfall der Kurve verlief weniger steil als bei ENU1, jedoch annähernd linear bis auf einen 180-Minuten-Wert von 136,9  $\mu\text{M}$ . Die Placebotiere zeigten wie im Fall von ENU1 innerhalb der ersten 20 Minuten einen Anstieg auf 266,8  $\mu\text{M}$  und erreichten im weiteren Verlauf ebenfalls ein Plateau.

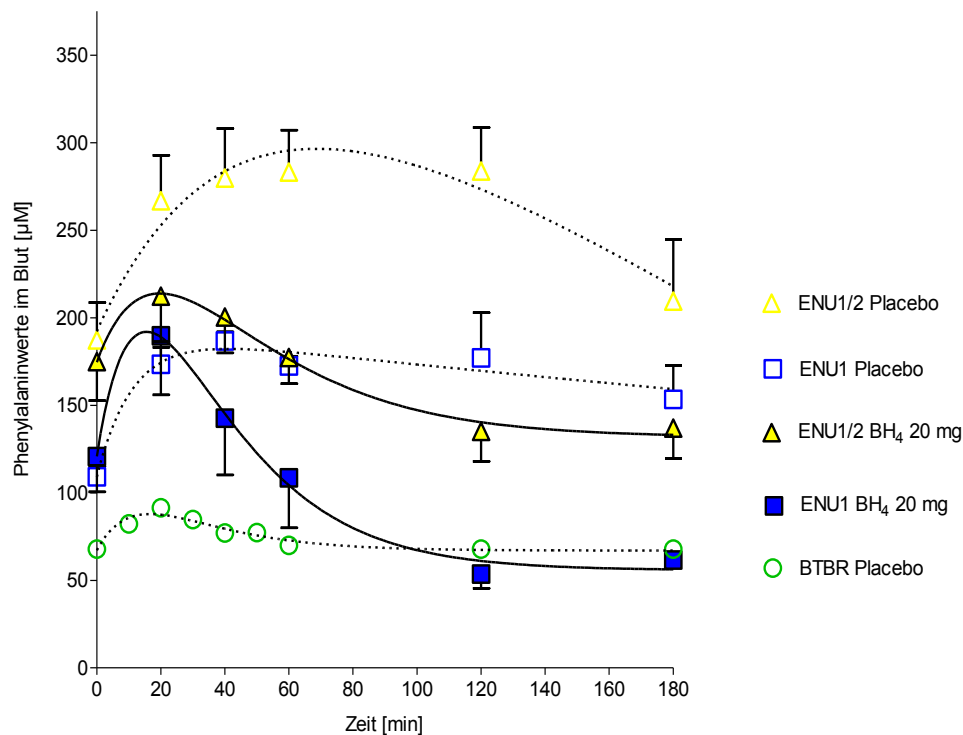


Abbildung 15: BH<sub>4</sub> Effekt von 20 mg/kg auf die Phenylalanin-Clearance im Blut von ENU1 und ENU1/2

Dargestellt sind die Phenylalaninwerte im Blut in ENU1 und ENU1/2 unter Behandlung mit BH<sub>4</sub> + Phe im Vergleich zu Placebo-Tieren (nur Phe-Verabreichung) und BTBR-Tieren (nur Phe-Verabreichung) in einem Zeitraum zwischen 0 und 180 Minuten.

Zusammenfassend führte BH<sub>4</sub> in ENU1 und ENU1/2 zu einer signifikanten Steigerung der Phenylalaninoxidation und hierdurch zu einer signifikanten Clearance der Plasmaphenylalaninkonzentration. ENU1 erreichten nach einer Injektion von 20 mg/kg BH<sub>4</sub> nach 180 Minuten Werte gesunder BTBR-Mäuse. ENU1/2 lagen mit 136,9 µM zwar leicht über BTBR Niveau, wiesen jedoch eine höhere Phenylalanin-Clearance als unbehandelte ENU1/2 Tiere auf.

### 3.1.2.3. Pharmakokinetik von BH<sub>4</sub> im Mausmodell

Um die folgenden Versuche zur Pharmakodynamik optimal planen zu können, wurde zunächst die Pharmakokinetik von BH<sub>4</sub> in den verschiedenen Mausstämmen charakterisiert. Dazu wurde den Tieren Blut zu den Zeitpunkten 0 (= vor der Behandlung) sowie 10, 20, 30, 60, 120 und 180 Minuten nach einer BH<sub>4</sub>-Injektion von 20 mg/kg entnommen.

Betrachtet man die Menge der Gesamtpterine im Blut vor Behandlung, so verhielten sich die verschiedenen Genotypen annähernd gleich (Abbildung 16). Die durchschnittliche Konzentration der Pterine in BTBR-Mäusen betrug 15,1 nmol/g Hb, in HZE1 13,1 nmol und in HZE2 13,0 nmol/g Hb. ENU1 kamen auf eine mittlere Menge von 19,4 nmol/g Hb, ENU1/2 auf 17,3 nmol/g Hb gefolgt von ENU2 mit 16,2 nmol/g Hb.

Nach einer intraperitonealen Injektion von 20 mg/kg  $\text{BH}_4$  stiegen die Werte der Gesamtpterine auf maximale Werte an (Abbildung 17). BTBR erreichten einen Maximalwert von 507,3 nmol/g Hb, HZE1 von 455,4 nmol/g Hb und HZE2 von 388,5 nmol/g Hb. ENU1 erreichten einen Maximalwert von 467,6 nmol/g Hb gefolgt von ENU1/2 mit 558,8 nmol/g Hb und ENU2 mit 697,4 nmol/g Hb.

Zusammenfassend war die Konzentration der Gesamtpterine im Blut bei den Mäusen vor der Behandlung mit  $\text{BH}_4$  vergleichbar, wobei nicht differenziert werden konnte, welches Pterin den größten Anteil an den Gesamtpterinen ausmachte.

Nach einer Injektion mit  $\text{BH}_4$  zeigten ENU2 den höchsten Wert der Gesamtpterine gefolgt von ENU1/2 und ENU1. Die Werte der korrespondierenden Wildtypiere und die der heterozygoten Tiere lagen jeweils unter den Werten von ENU1.

Zur Untersuchung, wie lange die Gesamtpterine im Blut der Tiere nachzuweisen sind und in wie weit sie sich diesbezüglich unterscheiden, wurde den Tieren 20 mg/kg  $\text{BH}_4$  i.p. verabreicht und Blut aus der Schwanzspitze nach o.g. Zeitplan entnommen (Abbildung 18).

Im Blut der gesunden BTBR-Mäuse war die Hälfte der Pterine zu einem Zeitpunkt von 28,4 Minuten noch nachzuweisen. Die heterozygoten Tiere lagen im Bereich der BTBR Mäuse mit 30,2 Minuten HWZ in HZE1 und 29,4 Minuten HWZ in HZE2. ENU1 erreichten eine HWZ von 25,3 Minuten gefolgt von ENU1/2 mit 21,2 Minuten und ENU2 mit 21,5 Minuten HWZ. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Konfidenzintervallen waren so gering, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen im Bezug auf die HWZ der Pterine im Blut auszuschließen ist.

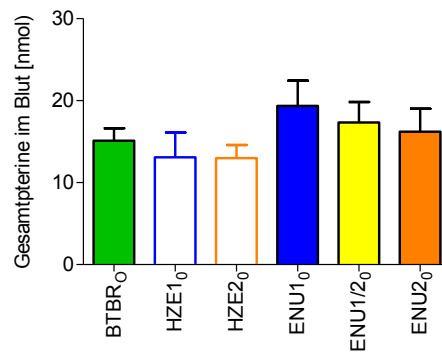


Abbildung 16: Pterinkonzentrationen im Blut (Nullwerte)

Dargestellt ist die Gesamtpterinkonzentration im Blut der verschiedenen Genotypen ohne Behandlung

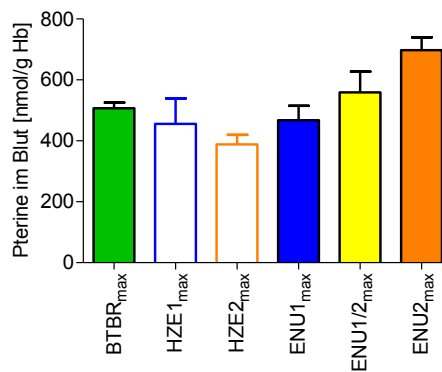
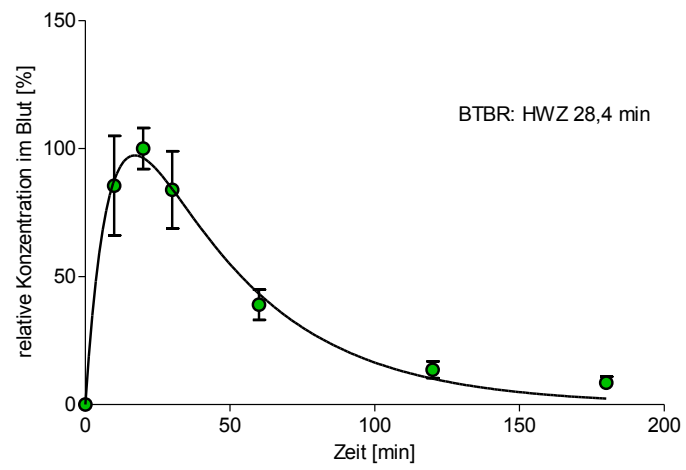


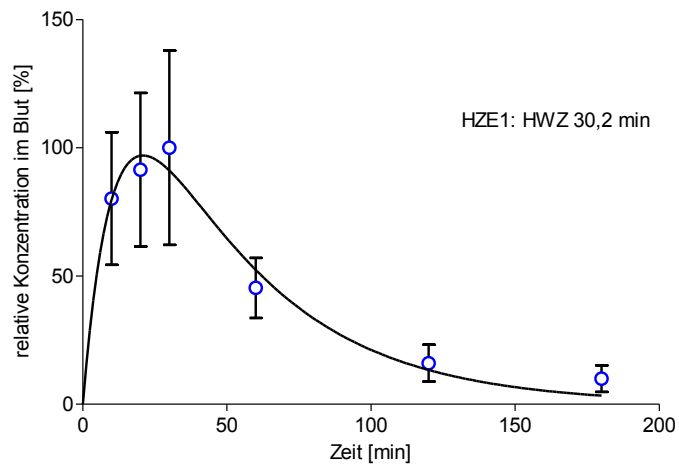
Abbildung 17: Maximalwerte der Pterinkonzentrationen im Blut nach Injektion von BH<sub>4</sub>

Dargestellt sind die Gesamtpterinkonzentrationen im Blut der verschiedenen Genotypen nach einer Injektion von 20 mg/kg BH<sub>4</sub>

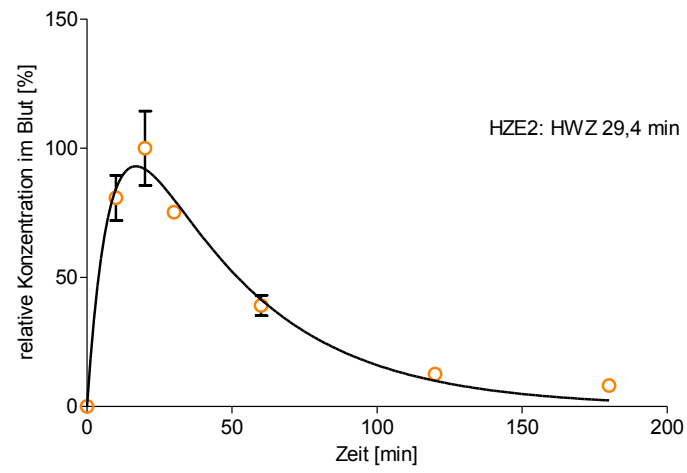
A



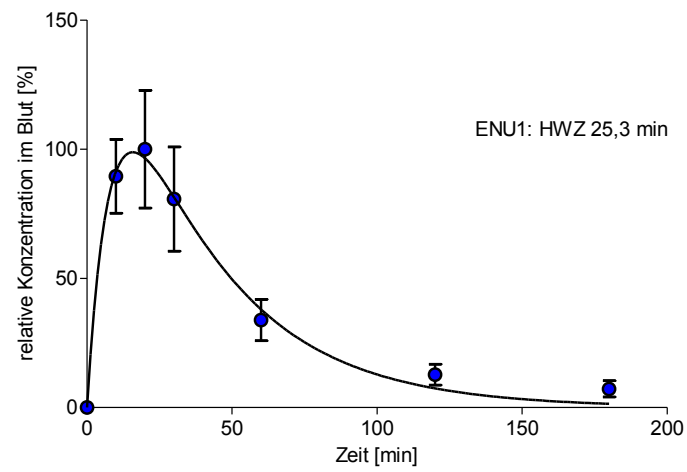
B

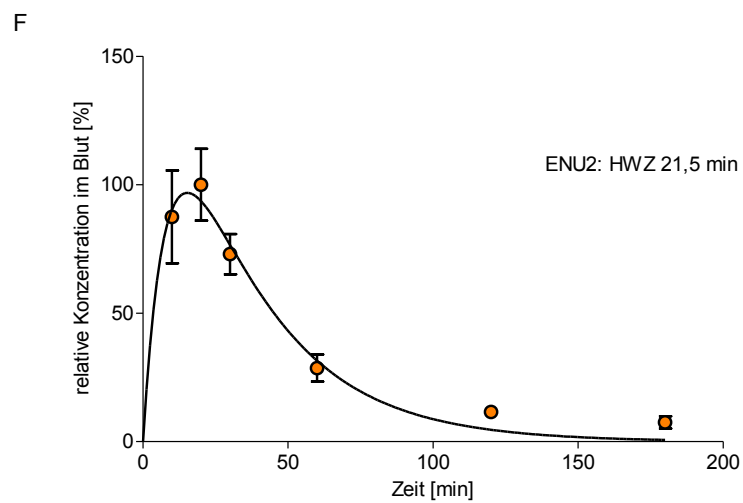
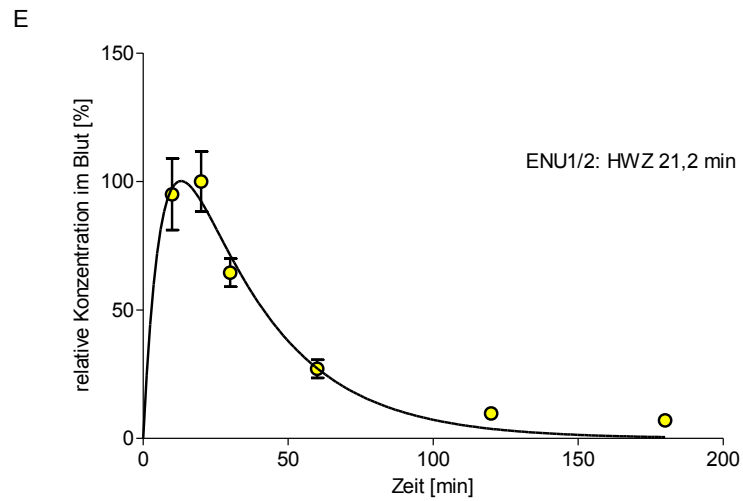


C



D





**Abbildung 18: Pterin-Kinetik im Blut**

Unter A-F ist die relative Konzentration der Gesamtpterine im Blut der verschiedenen Genotypen über einen Zeitraum von 180 Minuten nach einer Injektion von 20 mg/kg BH<sub>4</sub> dargestellt.

Zusammenfassend zeigte die Kinetik, dass die unterschiedliche Dosis-Wirkung der Genotypen unter Behandlung mit BH<sub>4</sub> nicht durch eine unterschiedliche Pharmakokinetik erklärt werden kann.

## 3.2. Alternative Moleküle

### 3.2.1. Effekt von intraperitoneal verabreichtem Na-Phenylbutyrat auf die Phenylalaninoxidation in *Pah<sup>enu1</sup>* und *Pah<sup>enu1/2</sup>*

Um den Effekt alternativer Moleküle auf die Phenylalaninoxidation in ENU1 und ENU1/2 zu untersuchen, führten wir Atemtests mit PBA in verschiedenen Dosierungen durch (Abbildung 19 und Abbildung 20). Wie BH<sub>4</sub> ist auch PBA ein pharmakologisches Chaperon, welches einen stabilisierenden Effekt auf die Proteinkonformationen hat. PBA ist ein bereits zugelassenes Medikament und würde eine kostengünstigere Alternative zu BH<sub>4</sub> darstellen.

In ENU1 führten alle i.p. verabreichten PBA Dosen (100, 250 und 500 mg/kg) zu einer Steigerung der Phenylalaninoxidation (Abbildung 19). Vergleicht man die kumulative Recovery mit den Werten der unbehandelten ENU1 (CUM104 =  $9,8 \pm 2,0\%$ ; n = 12), so führten bereits 250 mg/kg PBA zu einer signifikanten Steigerung (p = 0,007) der Phenylalaninoxidation. Die höchste kumulative Recovery von  $21,8 \pm 2,2\%$  erreichten ENU1 bei 500 mg/kg PBA (n = 3). Jedoch kam es bereits zwischen 250 mg/kg PBA ( $21,0 \pm 1,1\%$ ; n = 4) und 500 mg/kg zu keinem weiteren, wesentlichen positiven Dosiseffekt (p = 0,759).

Auch in ENU1/2 führte i.p. verabreichtes PBA in allen Dosierungen (50, 100, 250 und 500 mg/kg) zu einer Steigerung der Phenylalaninoxidation im Vergleich zu den unbehandelten ENU1/2 (Abbildung 20). Vergleicht man die kumulative Recovery mit den Werten der unbehandelten ENU1/2 (CUM104 =  $7,0 \pm 0,6\%$ , n = 20) so führten in ENU1/2 bereits 100 mg/kg PBA ( $16,6 \pm 2,5\%$ ; n = 4) zu einer signifikanten Steigerung (p = 0,0003) der Phenylalaninoxidation. Bei Dosierungen über 100 mg/kg erreichten ENU1/2 keinen weiteren, wesentlichen positiven Dosiseffekt und benötigten somit deutlich weniger PBA als ENU1 um zu einer maximalen Phenylalaninoxidation zu kommen.

Die größte kumulative Recovery von  $16,9 \pm 2,3\%$  erreichte ENU1/2 ebenfalls bei 500 mg/kg PBA (n = 4).



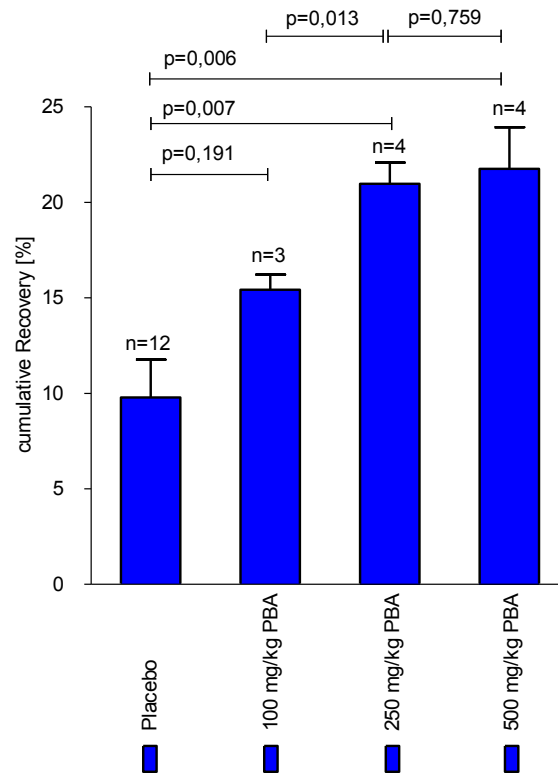
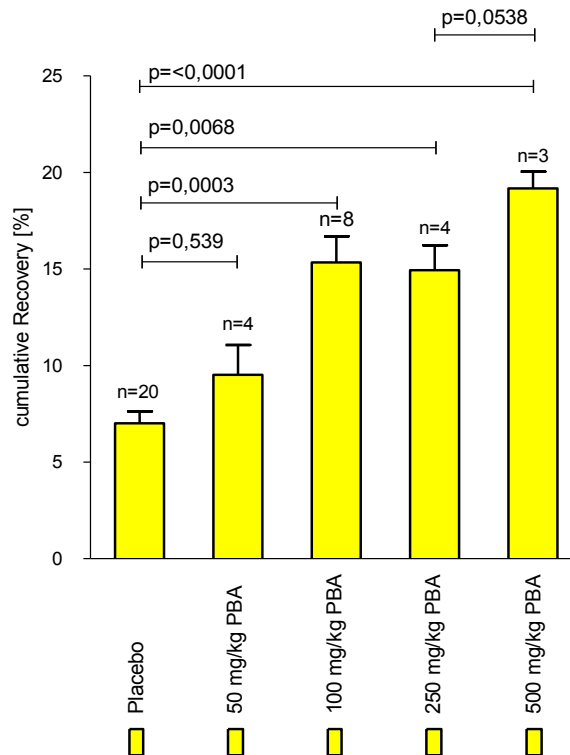


Abbildung 19: Phenylbutyrat-Dosiseffekt in ENU1

Dargestellt ist die Phenylalaninoxidation nach Verabreichung von Phenylbutyrat in den Dosierungen 100, 250 und 500 mg/kg i.p..



**Abbildung 20:** Phenylbutyrat-Dosiseffekt in ENU1/2

Dargestellt ist die Phenylalaninoxidation nach Verabreichung von Phenylbutyrat in den Dosierungen 50, 100, 250 und 500 mg/kg i.p..

Zusammenfassend führte PBA in ENU1 und ENU1/2 im Vergleich zu den unbehandelten Tieren zu einer signifikanten Steigerung der Phenylalaninoxidation. Bei ENU1 kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Phenylalaninoxidation bis zu einer Dosierung von 250 mg/kg. Höhere Dosen von PBA führten zu keinem weiteren positiven Dosiseffekt. In ENU1/2 wurden nur 100 mg/kg PBA benötigt, um eine maximale Steigerung der Phenylalaninoxidation zu erreichen. Auch hier war ein weiterer positiver Dosiseffekt mit höheren Dosierungen nicht signifikant. Im Rahmen weiterer Experimente beschränkten wir uns in ENU1/2 sowie in ENU1 auf eine Dosierung mit 100 mg/kg PBA.

#### **3.2.1.1. Additiver Effekt von Na-Phenylbutyrat und BH<sub>4</sub>**

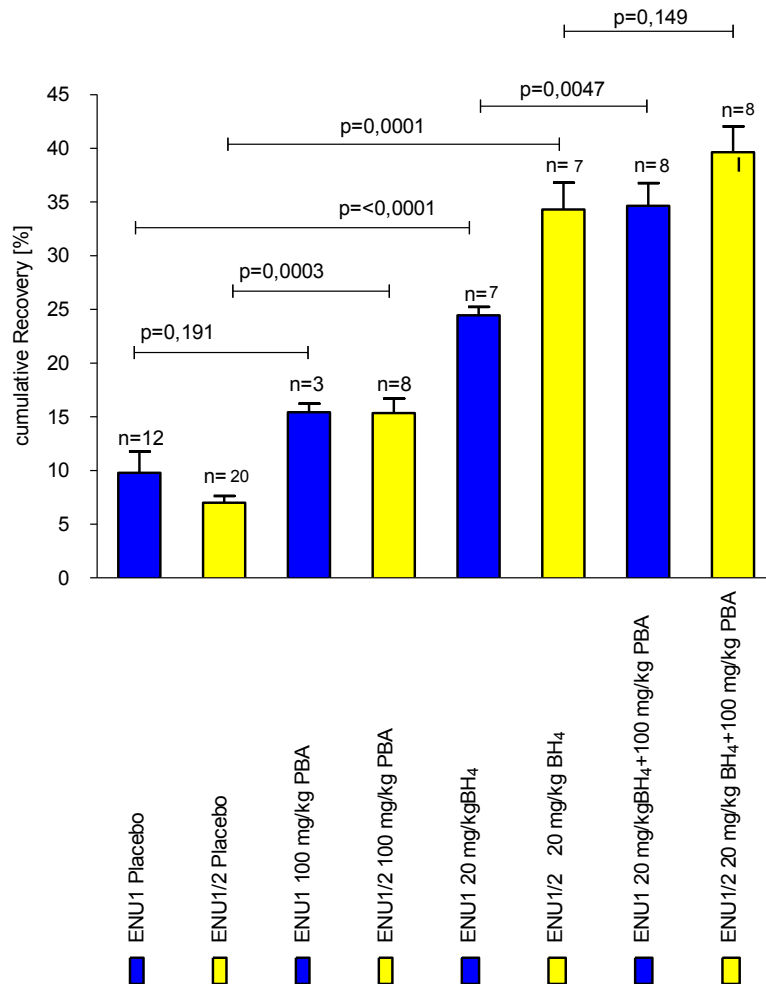
ENU1 und ENU1/2 wurden jeweils als Monotherapie mit 100 mg/kg Phenylbutyrat (i.p.) und 20 mg/kg Tetrahydrobiopterin (i.p.) behandelt. Als Kombinationstherapie wurden 100 mg/kg PBA eine halbe Stunde vor 20 mg/kg BH<sub>4</sub> injiziert. Zum Vergleich wurden Placebo-Versuche durchgeführt (Abbildung 21).

Bei alleiniger Gabe von 100 mg/kg PBA erreichten ENU1 (n = 3) eine kumulative Recovery von  $15,4 \pm 0,8 \%$ , dies lag im Bereich der unbehandelten ENU1 ( $9,8 \pm 2,0 \%$ ; n = 12).

Bei ENU1/2 (n = 4) hingegen führten bereits 100 mg/kg PBA ( $14,1 \pm 1,2 \%$ ) zu einer Steigerung der Phenylalaninoxidation im Vergleich zu unbehandelten ENU1/2 ( $7,0 \pm 0,6 \%$ ; n = 20).

Unter der Behandlung mit BH<sub>4</sub> (20 mg/kg) zeigten ENU1 ( $24,5 \pm 1,5 \%$ ; n = 7; p < 0,0001) und ENU1/2 ( $34,3 \pm 2,5 \%$ ; n = 7; p < 0,0001) eine signifikante Steigerung der Phenylalaninoxidation im Vergleich zu den unbehandelten Referenztieren. Durch eine Kombinationstherapie mit BH<sub>4</sub> und PBA ließ sich diese Zunahme der Phenylalaninoxidation weiter additiv steigern.

Bei der Kombinationstherapie mit 100 mg/kg PBA + 20 mg/kg BH<sub>4</sub> erreichten ENU1 (n = 8) eine durchschnittliche kumulative Recovery zum Zeitpunkt 104 Minuten von  $34,6 \pm 2,1 \%$  und somit eine signifikante Steigerung (p = 0,0047) gegenüber 20 mg/kg BH<sub>4</sub> als Monotherapie. ENU1/2 (n = 8) erreichten in der Kombinationstherapie eine durchschnittliche kumulative Recovery nach 104 Minuten von  $39,6 \pm 2,4 \%$  gegenüber der kumulativen Recovery bei alleiniger BH<sub>4</sub>-Behandlung von  $34,3 \pm 3,4 \%$  (p < 0,15).



**Abbildung 21:** Additiver Effekt von BH<sub>4</sub> und Phenylbutyrat in ENU1 und ENU1/2

Dargestellt ist die Phenylalaninoxidation in ENU1 und ENU1/2 unter Monotherapie mit BH<sub>4</sub> und PBA sowie unter Kombinationstherapie von BH<sub>4</sub> und PBA.

Zusammenfassend führten 20 mg/kg BH<sub>4</sub> als Monotherapie zu einer signifikanten Steigerung der Phenylalaninhydroxylase in ENU1 und ENU1/2, wohingegen PBA als Monotherapie mit 100mg/kg nur in ENU1/2 einen eindeutigen Effekt zeigen konnte. ENU1 benötigte höhere Dosierungen von PBA um einen signifikanten Anstieg der Phenylalaninoxidation zu verzeichnen (Abbildung 19). In Kombination führten PBA und BH<sub>4</sub> zu einer additiven Steigerung der Aktivität der Phenylalaninhydroxylase sowohl in ENU1 als auch in ENU1/2. Hierbei wurden in beiden Fällen Werte der kumulativen Recovery im Bereich gesunder BTBR Mäuse erreicht.

### 3.2.1.2. Blutphenylalaninwerte unter Kombinationstherapie

Vor und nach dem Atemtest, d.h. unmittelbar vor und 135 min nach PBA + BH<sub>4</sub>, wurde die Blutphenylalaninkonzentration bestimmt, um zu prüfen, ob es zu einem Abfall der Phenylalaninkonzentration im Blut kommt (Abbildung 22). Bei der Bestimmung von Phenylalanin im Blut erreichten ENU1 vor der Injektion der Kombinationstherapie Werte von durchschnittlich 172,3 µmol/l (n = 18). Ungefähr 135 Minuten nach der Injektion von 100 mg/kg PBA + 20 mg/kg BH<sub>4</sub> erreichten ENU1 Werte von 88,3 µmol/l (n = 6) Phenylalanin und befanden sich somit auch in Bezug auf die Blutwerte im BTBR-Bereich.

ENU1/2 erreichten vor der Injektion der Kombinationstherapie Werte von durchschnittlich 188,0 µmol/l (n = 20) Phenylalanin im Blut und sanken ca. 135 Minuten nach der Injektion auf Werte von 101,3 µmol/l (n = 7). ENU1/2 lagen somit leicht über BTBR Niveau.

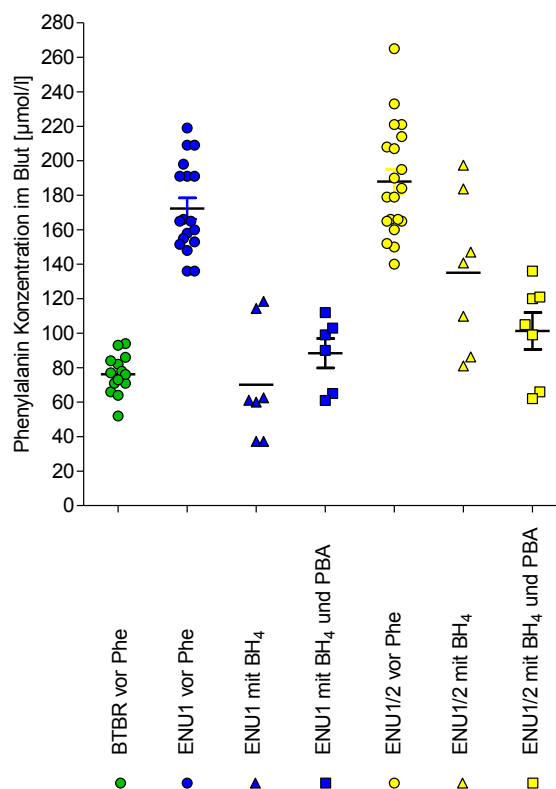


Abbildung 22: Effekt von 100 mg/kg PBA + 20 mg /kg BH<sub>4</sub> i.p. auf die Blutphenylalaninkonzentration in ENU1 und ENU1/2

Dargestellt sind die basalen Phenylalaninwerte im Blut in ENU1 und ENU1/2 sowie die Phenylalaninwerte nach Behandlung mit BH<sub>4</sub> und nach Kombinationstherapie.

Zusammenfassend führte die Kombinationstherapie sowohl in ENU1 als auch in ENU1/2 zu einem Abfall der Phenylalaninkonzentration im Blut. Dabei lagen nach ca. 135 Minuten ENU1 im Bereich gesunder BTBR-Tiere und ENU1/2 leicht über den Werten gesunder BTBR-Tiere.

## 4. Diskussion

Die Phenylketonurie ist eine Erkrankung, die in der Geschichte bereits viele Meilensteine durchlaufen hat. Sie entwickelte sich von der klassisch genetischen, nicht therapierbaren Erkrankung [Fölling, 1934] über die Entdeckung einer aufwendigen diätetischen Therapie hin zum heutigen Prototyp der behandelbaren genetischen Proteinfaltungserkrankung. In den frühen 50er Jahren zeigten sich durch die Entdeckung der phenylalaninarmen Diät erste Behandlungserfolge für Patienten mit PKU [Bickel et al., 1954]. Dies machte die PKU zur ersten behandelbaren vererbten Stoffwechselerkrankung [Muntau and Gersting, 2010]. Ende der 90er Jahre legten Kure et al. erstmals den Grundstein für eine medikamentöse Behandlung [Kure et al., 1999]. Sie beschrieben Patienten, die nach Verabreichung von BH<sub>4</sub>, dem Kofaktor der Phenylalaninhydroxylase, einen Abfall der Phenylalaninkonzentration im Blut zeigten. Vor allem Patienten mit milden Formen der PKU, welche eine Restaktivität der PAH aufwiesen, konnten gute Erfolge mit der BH<sub>4</sub>-Kofaktorbehandlung zeigen [Bernegger and Blau, 2002]. 2007 wurde BH<sub>4</sub> dann als erstes Arzneimittel zur Behandlung der PKU zugelassen. Dies führte zu einem Paradigmenwechsel in der Behandlung von Patienten mit PKU. Die diätetische Therapie konnte zum ersten Mal mit einer medikamentösen Therapie kombiniert werden. Heute wissen wir, dass bis zu 60% aller PKU Patienten von einer Behandlung mit BH<sub>4</sub> profitieren.

Bei Markteinführung war der molekulare Wirkmechanismus von BH<sub>4</sub> jedoch noch nicht klar. *In vitro* Studien wiesen allerdings darauf hin, dass BH<sub>4</sub> als pharmakologisches Chaperon wirkt, das die fehlgefaltete PAH von PKU-Patienten gegen proteolytischen Abbau schützt. Ein Tiermodell für *in vivo* Untersuchungen des Wirkmechanismus von BH<sub>4</sub> oder anderen therapeutischen Kandidatenmolekülen fehlte jedoch. Inzwischen sind solche Tiermodelle für *in vivo* Untersuchungen entwickelt. Murine Modelle der humanen BH<sub>4</sub> responsiven PKU wurden kürzlich von unserer Arbeitsgruppe untersucht. Dabei reagierten die murinen PKU-Modelle *Pah*<sup>enu1</sup> und *Pah*<sup>enu1/2</sup> auf BH<sub>4</sub>-Verabreichung mit einer Steigerung der *in vivo* Phenylalaninoxidation, während *Pah*<sup>enu2</sup> Tiere nicht auf BH<sub>4</sub> ansprachen [Zsifkovits 2007, Lagler 2010, Gersting 2010].

In dieser Arbeit wurde anhand mehrerer unabhängiger *in vivo* Methoden die Hypothese, dass *Pah*<sup>enu1</sup> und *Pah*<sup>enu1/2</sup> murine Modelle der humanen BH<sub>4</sub> responsiven PKU sind,

bestätigt. Ausserdem charakterisierten wir in beiden Mausmodellen die pharmakodynamischen und phamakokinetischen Effekte von BH<sub>4</sub> und identifizierten genotyp-spezifische Unterschiede in der BH<sub>4</sub>-Pharmakodynamik. Zusätzlich zeigten wir, dass Natriumphenylbutyrat als Kandidatenmolekül für die Behandlung der BH<sub>4</sub>-responsiven PKU in Frage kommt.

Für unsere Versuchsreihen verwendeten wir Mäuse mit BTBR Hintergrund. *Pah<sup>enu1</sup>* und *Pah<sup>enu2</sup>* sind Mäuse, die durch Keimbahnmutagenese mit N-Ethyl-N\*-Nitroso-Harnstoff (ENU) im PAH-Gen mutagenisiert wurden. *Pah<sup>enu1</sup>* trägt homozygot die Mutation V106A, welche die regulatorische Domäne der PAH betrifft und somit zur leichten PAH-Defizienz mit milder Hyperphenylalaninämie führt. Durch die F263S-Mutation in der katalytischen PAH-Domäne weist *Pah<sup>enu2</sup>* einen fast vollständigen Funktionsverlust der PAH und eine ausgeprägte Hyperphenylalaninämie auf. Wir verwendeten auch *Pah<sup>enu1/2</sup>*, die compound-heterozygote Kreuzung dieser beiden Mäuselinien. Diese zeigt einen intermediären Phänotyp [Sarkissian et al., 2000; McDonald et al., 2002].

Zur Unterscheidung der Genotypen führten wir <sup>13</sup>C-Phenylalaninatemtests durch. Wir beobachtete eine graduell abnehmende Phenylalaninoxidation im <sup>13</sup>C-Phenylalaninatemtest von Wildtyp über *Pah<sup>enu1</sup>* und *Pah<sup>enu1/2</sup>* zu *Pah<sup>enu2</sup>*. Spiegelbildlich konnten zunehmende Phenylalaninkonzentrationen im Blut der Mäuse gemessen werden. Sowohl der Atemtest als auch die Blutuntersuchungen ließen eine zuverlässige Diskriminierung der Genotypen zu und bestätigten in Übereinstimmung mit Vorarbeiten von Sarkissian [Sarkissian et al., 2000] den milden bzw. intermediären Phänotyp von *Pah<sup>enu1</sup>* und *Pah<sup>enu1/2</sup>* *in vivo*.

In einem ersten Experiment untersuchten wir die Regulation der PAH *in vivo*. Die PAH ist ein intensiv reguliertes Enzym, das durch das Substrat Phenylalanin in eine aktivierte instabile Form überführt wird und vom Kofaktor BH<sub>4</sub> in eine stabile aber inaktive „Ruheform“ [Shiman1994a, Shiman1994b, Xia1994]. Durch diesen Mechanismus kann die PAH das postprandial anfallende Phenylalanin hocheffizient zu Tyrosin umsetzen, während bei niedrigen Phenylalaninkonzentrationen die BH<sub>4</sub>-induzierte Inhibition eine Hypophenylalaninämie verhindert. Um die Regulierung der murinen PAH *in vivo* zu untersuchen, verabreichten wir BH<sub>4</sub>. Die Verabreichung von BH<sub>4</sub> führte bei Wildtypmäusen ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Phenylalaninoxidation. Dabei zeigte sich im Bereich von 5-80 µg/g i.p. kein Dosisseffekt. Dies weist darauf hin, dass auch bei der murinen



Wildtyp-PAH eine Kofaktor-Inhibition durch BH<sub>4</sub> auftritt. Die Kofaktor-Inhibition beim Wildtyp scheint im Vergleich zum Chaperon-Effekt bei *Pah<sup>enu1</sup>* und *Pah<sup>enu1/2</sup>* bereits bei deutlich niedrigeren Dosierungen maximal zu wirken (5 µg/g vs. 20 µg/g).

Die Gabe von 500 µg/g Phenylalanin bewirkte eine signifikante Steigerung der Phenylalaninoxidation, entsprechend einer Substrataktivierung [Kure 2004]. Diese war noch ausgeprägter, wenn gleichzeitig BH<sub>4</sub> verabreicht wurde. Dies ist in Einklang mit Kures Annahme, dass bei sehr hohen Phenylalaninkonzentrationen die Steigerung der PAH Aktivität durch BH<sub>4</sub>-Gaben, dem Ausgleich einer suboptimalen Konzentration von endogenem BH<sub>4</sub> entspricht [Kure 2004].

Zur Charakterisierung der pharmakodynamischen Effekte von BH<sub>4</sub> führten wir in einem weiteren Experiment Atemtests unter Substitution von BH<sub>4</sub> in *Pah<sup>enu1</sup>* und *Pah<sup>enu1/2</sup>* durch. Wir bestätigten dabei die BH<sub>4</sub>-Responsivität in beiden Modellen. Erhebliche Unterschiede zeigten sich jedoch in der Effektgröße von BH<sub>4</sub> in *Pah<sup>enu1</sup>* und *Pah<sup>enu1/2</sup>*. Während bei *Pah<sup>enu1</sup>* 20 µg/g BH<sub>4</sub> im kombinierten Phenylalanin-BH<sub>4</sub>-Belastungstest ein Absinken der Phenylalaninkonzentration um 67,5% bewirkte, fiel *Pah<sup>enu1/2</sup>* nur um 35,5% ab. *Pah<sup>enu1/2</sup>* lag damit nur knapp über dem klinisch etablierten Cut-Off für Responsivität von 30% [Muntau, 2002], obwohl die Phenylalaninoxidation durch dieselbe BH<sub>4</sub> Dosis vollständig normalisiert wurde und sogar über der von *Pah<sup>enu1</sup>* lag. Auch die Dosiswirkung unterschied sich in beiden Mäusen. Beide zeigten im Dosisbereich bis 20 µg/g einen positiven Dosiseffekt. Bei Dosierungen über 20 µg/g wies *Pah<sup>enu1</sup>* ein Plateau auf, während höhere Dosierungen bei *Pah<sup>enu1/2</sup>* zu suboptimaler Phe-Oxidation führten. Dieser negative Dosiseffekt in höheren Dosierungen bei *Pah<sup>enu1/2</sup>* ist nicht überraschend, da pharmakologische Chaperone häufig in höherer Dosis als Inhibitoren wirken [Fan 2008]. Um die Ursache der divergenten Pharmakodynamik zu klären, untersuchten wir die Plasmapharmakokinetik von BH<sub>4</sub> in beiden responsiven Modellen. Dazu wurde den Tieren BH<sub>4</sub> intraperitoneal injiziert und der Eliminationsprozess der Gesamtpterine im Blut beobachtet. Weder die endogene Konzentration der Pterine noch der Verlauf der Plasmakonzentration über die Zeit nach Verabreichung von exogenem BH<sub>4</sub> ergab signifikante Unterschiede zwischen *Pah<sup>enu1</sup>* und *Pah<sup>enu1/2</sup>*. Diese Ergebnisse könnten von erheblicher Bedeutung für die klinische Behandlung von Patienten mit BH<sub>4</sub>-responsiver PKU sein, denn sie weisen darauf hin, dass

genotypspezifische Unterschiede in der Dosiswirkung berücksichtigt werden sollten und dass der  $^{13}\text{C}$ -Phenylalaninatemtest ein geeignetes Instrument hierfür sein könnte.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirkung von Natriumphenylbutyrat (PBA) als kostengünstigere Behandlungsalternative zu  $\text{BH}_4$  untersucht. Nachdem bestätigt wurde, dass die untersuchten murinen Modelle und etablierten Methoden ausgezeichnet für die pharmakodynamische Evaluation des pharmakologischen Chaperons  $\text{BH}_4$  geeignet sind, wurde die Wirkung von PBA mit analogen Methoden untersucht. PBA ist ein chemisches Chaperon und Histondeacetylaseinhibitor, der bei sehr unterschiedlichen Fehlfaltungspathologien wie Diabetes mellitus Typ II, zystische Fibrose, Glaukom und zerebraler Ischämie positive Effekte auf die Faltung aberranter Zielproteine hat [Özcan 2006, Qi2004, Hin Fai Yam 2007, Lee 2010]. In unseren Versuchen steigerten bereits Einzelgaben der Substanz die Phenylalaninoxidation in den Mausmodellen  $Pah^{enu1}$  und  $Pah^{enu1/2}$ . Es wurde ein positiver Dosiseffekt im Bereich von 100-500  $\mu\text{g/g}$  mit einer maximalen Phenylalaninoxidation nach 500  $\mu\text{g/g}$  beobachtet. Die kombinierte Verabreichung von  $\text{BH}_4$  20  $\mu\text{g/g}$  und PBA 100  $\mu\text{g/g}$  ergab einen additiven Effekt im Vergleich zur alleinigen Verabreichung von  $\text{BH}_4$  20  $\mu\text{g/g}$ . Die Plasmaphenylalaninkonzentrationen lagen nach kombinierter Gabe von  $\text{BH}_4$  und PBA bei  $Pah^{enu1}$  im Bereich des Wildtyps und bei  $Pah^{enu1/2}$  leicht darüber, jedoch signifikant niedriger als nach alleiniger Gabe von  $\text{BH}_4$ . Das könnte darauf hinweisen, dass gerade Individuen mit geringer Wirkung von  $\text{BH}_4$  auf die Plasmaphenylalaninkonzentration von einer PBA-Coadministration profitieren. Die klinische Relevanz dieser Erkenntnis ist besonders hoch, da Natriumphenylbutyrat als Ammonaps® bereits als Arzneimittel für die Behandlung von Harnstoffzyklusdefekten zugelassen ist und die Hypothese somit zeitnah klinisch überprüft werden kann. Darüber hinaus ist mit *Glycerol Phenylbutyrate* (Lee 2010) ein zweites Präparat bereits in klinischer Entwicklung, für das eine gute Verträglichkeit bei gesunden Probanden nachgewiesen wurde [Mc Guire 2010].

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit anhand umfangreicher *in vivo* Tests nachgewiesen, dass  $Pah^{enu1}$  und  $Pah^{enu1/2}$  murine Modelle der humanen  $\text{BH}_4$  responsiven PKU sind. Die hier etablierten experimentellen Methoden bildeten die Grundlage für die Erkenntnis, dass erhebliche genotypspezifische Unterschiede in der Pharmakodynamik von  $\text{BH}_4$  bestehen. Das bedeutet, dass  $\text{BH}_4$  bei Vorliegen unterschiedlicher Genotypen unterschiedliche Wirkungen entfaltet. Diese experimentellen Daten haben im Sinne der personalisierten Medizin einen

unmittelbaren Einfluss auf die klinische Betreuung von Patienten mit PKU. So haben wir beispielsweise gelernt, dass bei Vorliegen einer compound-Heterozygotie mit einer Nullmutation auf einem Allel der Wirkungseintritt verzögert erfolgt, weniger ausgeprägt ist und kürzer anhält als bei Vorliegen zweier milder Mutationen. Interessanterweise kann im Falle der compound-Heterozygotie die Wirkung durch eine Dosissteigerung nicht verstärkt werden. Im Gegenteil, diese führt bei einer Dosis >20 mg/kg zu einer Abnahme des positiven Effektes auf die PAH-Enzymaktivität.

Darüber hinaus konnte Natriumphenylbutyrat als weitere Option zur Steigerung der Effektivität von BH<sub>4</sub> identifiziert werden. Die Kombination eines chemischen Chaperons mit einem pharmakologischen Chaperon ist ein bislang unbeschriebener Therapieansatz, der auf andere Fehlfaltungserkrankungen übertragen werden kann. Für Erkrankungen, bei denen DNA-Punktmutationen zu Proteinefehlfaltung und somit zu Funktionsverlust von Enzymen führen, kann ein Therapieansatz mit pharmakologischen Chaperonen vielversprechend sein. Dieser Therapieansatz könnte der Ausgangspunkt für eine neue Klasse pharmazeutischer Produkte im orphan-Bereich sein.

Inzwischen wurde die Hypothese aufgestellt, dass *missense* Mutationen regelhaft zu Proteinefehlfaltung und gestörter Proteinkonformation führen [Muntau and Gersting, 2010]. Bei mehr als 20.000 genetischen Erkrankungen, 130.000 krankheitsauslösenden Mutationen mit 60% *missense* Mutationen, kleinen Insertionen und Deletionen öffnet sich ein weites Feld für neue therapeutische Strategien für Menschen mit unterschiedlichsten genetischen Erkrankungen, für die es bisher keine oder nur nicht zufriedenstellende Behandlungsoptionen gibt. Die von uns im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit etablierte experimentelle Testbatterie zur longitudinalen Evaluation der Wirksamkeit pharmakologischer Chaperone *in vivo* wird auch in Zukunft Anwendung bei der Entwicklung weiterer neuer Medikamente finden.

## Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1:</i> Die Phenylalaninhydroxylase .....	9
<i>Abbildung 2:</i> Der Stoffwechsel von Phenylalanin und Tetrahydrobiopterin (BH <sub>4</sub> ).....	10
<i>Abbildung 3:</i> Strukturformel von Na-Phenylbutyrat [Pubchem Compound, 2009] .....	15
<i>Abbildung 4:</i> Weg der L-[1- <sup>13</sup> C]-Phenylalaninoxidation und <sup>13</sup> CO <sub>2</sub> -Produktion [Zsifkovits, 2007] .....	17
<i>Abbildung 5:</i> Maus-Atemtest .....	22
<i>Abbildung 6:</i> Messvorgang / IRIS-Konfiguration .....	26
<i>Abbildung 7:</i> CO <sub>2</sub> Recovery .....	29
<i>Abbildung 8:</i> Phenylalaninkonzentrationen im Blut .....	39
<i>Abbildung 9:</i> <i>In vivo</i> Phenylalaninoxidation in Wildtyp und PAH-defizienten Mäusen .....	40
<i>Abbildung 10:</i> Kumulative Recovery nach Verabreichung von Placebo .....	40
<i>Abbildung 11:</i> Inhibitorischer Effekt von BH <sub>4</sub> in BTBR .....	42
<i>Abbildung 12:</i> BH <sub>4</sub> Dosis-Effekte nach Phenylalanin-Load (500 mg/kg) in Wildtyp Mäusen (BTBR) .....	43
<i>Abbildung 13:</i> BH <sub>4</sub> -Effekt in ENU1.....	45
<i>Abbildung 14:</i> BH <sub>4</sub> -Effekt in ENU1/2 .....	45
<i>Abbildung 15:</i> BH <sub>4</sub> Effekt von 20 mg/kg auf die Phenylalanin-Clearance im Blut von ENU1 und ENU1/2.....	47
<i>Abbildung 16:</i> Pterinkonzentrationen im Blut (Nullwerte) .....	49
<i>Abbildung 17:</i> Maximalwerte der Pterinkonzentrationen im Blut nach Injektion von BH <sub>4</sub> .....	49
<i>Abbildung 18:</i> Pterin-Kinetik im Blut .....	52
<i>Abbildung 19:</i> Phenylbutyrat-Dosiseffekt in ENU1 .....	54
<i>Abbildung 20:</i> Phenylbutyrat-Dosiseffekt in ENU1/2.....	55
<i>Abbildung 21:</i> Additiver Effekt von BH <sub>4</sub> und Phenylbutyrat in ENU1 und ENU1/2 .....	57
<i>Abbildung 22:</i> Effekt von 100 mg/kg PBA + 20 mg /kg BH <sub>4</sub> i.p. auf die Blutphenylalaninkonzentration in ENU1 und ENU1/2 .....	58

## **Tabellenverzeichnis**

<i>Tabelle 1:</i> Löslichkeit von Phenylalanin in Wasser in Abhängigkeit der Temperatur [Merck online, 2009] .....	21
<i>Tabelle 2:</i> Berechnung der kumulative Recovery .....	24
<i>Tabelle 3:</i> IRIS-Konfiguration.....	27

## Literaturverzeichnis

1. Acosta PB, Stepnick-Gropper S, Clarke-Sheehan N, Wenz E, Cheng M, Anderson K, Koch R: Trace element status of PKU children ingesting an elemental diet. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1987;11:287-292.
2. Belanger-Quintana A, Garcia MJ, Castro M, Desviat LR, Perez B, Mejia B, Ugarte M, Martinez-Pardo M: Spanish BH(4)-responsive phenylalanine hydroxylase-deficient patients: Evolution of seven patients on long-term treatment with tetrahydrobiopterin. *Mol Genet Metab* 2005;86:61-66.
3. Bernegger C, Blau N: High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninurias: a study of 1,919 patients observed from 1988 to 2002. *Mol Genet Metab* 2002;77:304-313.
4. Bickel H, Gerrard JW, Hickmans EM: The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenylketonuric child. *Acta Paediatr* 1954; 43:64-77.
5. Blau N: PAHvdb: International database of variations in Phenylalanine Hydroxylase gene, [biopku.org/home/pah.asp](http://biopku.org/home/pah.asp), Stand 31.07.2013.
6. Blau N, van Spronsen F J, Levy H L: Phenylketonuria. *Lancet* 2010; 376:1417-1427
7. Blau N, Bernegger C, Trefz FK: Tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninaemia due to homozygous mutations in the phenylalanine hydroxylase gene. *Eur J Pediatr* 2003;162:196.
8. Blau N, Trefz FK: Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency: possible regulation of gene expression in a patient with the homozygous L48S mutation. *Mol Genet Metab* 2002;75:186-187.
9. Burgard P, Bremer HJ, Buhrdel P, Clemens PC, Monch E, Przyrembel H, Trefz FK, Ullrich K: Rationale for the German recommendations for phenylalanine level control in phenylketonuria 1997. *Eur J Pediatr* 1999;158:46-54.
10. Burgard P, Schmidt E, Rupp A, Schneider W, Bremer HJ: Intellectual development of the patients of the German Collaborative Study of children treated for phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1996;155 Suppl 1:S33-S38.
11. Cerone R, Schiaffino MC, Fantasia AR, Perfumo M, Birk ML, Blau N: Long-term follow-up of a patient with mild tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2004;81:137-139.
12. Curtius HC, Blau N, Kuster TP. In: Hommes FA, editor. *Techniques in diagnostic human biochemical genetics*. New York: Wiley-Liss; 1991. p. 377–396.
13. Danks DM, Cotton RG, Schlesinger P: Letter: Tetrahydrobiopterin treatment of variant form of phenylketonuria. *Lancet* 1975;2:1043.

14. Desviat LR, Perez B, Belanger-Quintana A, Castro M, Aguado C, Sanchez A, Garcia MJ, Martinez-Pardo M, Ugarte M: Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH<sub>4</sub> loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype. *Mol Genet Metab* 2004;83:157-162.
15. Dhondt JL, Ardouin P, Hayte JM, Farriaux JP: Developmental aspects of pteridine metabolism and relationships with phenylalanine metabolism. *Clin Chim Acta* 1981;116:143-152.
16. Donlon K, Levy H, Scriver CR. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In Scriver, CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B Kinzler KW (eds), *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, 2007.
17. Doskeland AP, Flatmark T: Recombinant human phenylalanine hydroxylase is a substrate for the ubiquitin-conjugating enzyme system. *Biochem J* 1996;319 (Pt 3):941-945.
18. Erlandsen H, Pey AL, Gamez A, Perez B, Desviat LR, Aguado C, Koch R, Surendran S, Tying S, Matalon R, Scriver CR, Ugarte M, Martinez A, Stevens RC: Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:16903-16908.
19. Erlandsen H, Stevens RC: A structural hypothesis for BH<sub>4</sub> responsiveness in patients with mild forms of hyperphenylalaninaemia and phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2001;24:213-230.
20. Erlandsen H, Patch MG, Gamez A, Straub M, Stevens RC: Structural studies on phenylalanine hydroxylase and implications toward understanding and treating phenylketonuria. *Pediatrics* 2003;112:1557-1565.
21. European Medicines Agency (EMA), [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), Stand 31.07.2013.
22. Fan JQ. A counterintuitive approach to treat enzyme deficiencies: use of enzyme inhibitors for restoring mutant enzyme activity. *Biol Chem* 2008; 389:1–11.
23. Feillet F, Clarke L, Meli C, Lipson M, Morris AA, Harmatz P, Mould DR, Green B, Dorenbaum A, Giovannini M, Foehr E. Pharmacokinetics of sapropterin in patients with phenylketonuria. *Clin Pharmacokinet* 2008; 47:817-825.
24. Fiori L, Fiege B, Riva E, Giovannini M: Incidence of BH(4)-responsiveness in phenylalanine-hydroxylase-deficient Italian patients. *Mol Genet Metab* 2005;86:67-74.
25. Fölling A: Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Inbicillität. *Ztschr Phsiol Chem* 1934; 227:169

26. Gersting S W, Kemter K F, Staudigl M, Messing D D, Danecka M K, Lagler F B, Sommerhoff C P, Roscher A A, Muntau A C. Loss of Function in Phenylketonuria is Caused by Impaired Molecular Motions and Conformational Instability. *J Hum Gen* 2008; 83:5-17.
27. Gersting S.W., Lagler F.B., Eichinger A., Kemter K.F., Danecka M.K., Messing D.D., Staudigl M., Domdey K.A., Zsifkovits C., Fingerhut R. et al. *Pahenu1* is a mouse model for tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency and promotes analysis of the pharmacologic chaperone mechanism *in vivo*. *Hum Mol Genet* 2010; 15; 19 (10):2039-49.
28. Gersting S W, Staudigl M, Truger M S, Messing D D, Danecka M K, Sommerhoff C P, Kemter K F, Muntau A C: Activation of Phenylalanine Hydroxylase Induces Positive Cooperativity toward the Natural Cofactor. *Biol Chem* 2010; 285:30686-30697.
29. Gregersen N: Protein misfolding disorders: Pathogenesis and intervention. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2006; 29 (2-3):456-470.
30. Hammond PD, Stutzenberger FJ, Butler RN, Read LC, Davidson GP: Factors affecting the validity of the  $^{13}\text{C}$ -urea breath test for *in vivo* determination of Helicobacter pylori infection status in a mouse model. *Helicobacter* 1999;4:260-265.
31. Hennermann, J. B., Vetter, B, Kulozik, A. E., and Mönch, E. Partial and total tetrahydrobiopterin-responsiveness in classical and mild phenylketonuria (PKU). *J Inherit Metab Dis.* 25 (Suppl.1), 23. 2002.
32. Hennermann JB, Buhrer C, Blau N, Vetter B, Monch E: Long-term treatment with tetrahydrobiopterin increases phenylalanine tolerance in children with severe phenotype of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2005;86:86-90.
33. Holtzman NA, Kronmal RA, van Doorninck W, Azen C, Koch R: Effect of age at loss of dietary control on intellectual performance and behavior of children with phenylketonuria. *N Engl J Med* 1986;314:593-598.
34. Ito A, Kohno T, Hosoi I, Ohshima J, Ishii Y, Asai S, Ishikawa K, Shibata K: High correlation between results of the  $[1-^{13}\text{C}]$ -phenylalanine breath test and phenylalanine hydroxylase (EC 1.14.16.1) activity of the liver in rats. *Digestion* 2001;63:130-138.
35. Jochum F, Terwolbeck K, Meinhold H, Behne D, Menzel H, Lombeck I: Effects of a low selenium state in patients with phenylketonuria. *Acta Paediatr* 1997;86:775-777.
36. Koch H.: Phenylbutyrat: Pharmakologisches Profil und möglicher therapeutischer Einsatz. *Österreichische Apotheker-Zeitung* 2003; 21
37. Kure S, Sato K, Fujii K, Aoki Y, Suzuki Y, Kato S, Matsubara Y: Wild-type phenylalanine hydroxylase activity is enhanced by tetrahydrobiopterin supplementation *in vivo*: an implication for therapeutic basis of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 2004;83:150-156.



38. Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, Sakamoto O, Fujii K, Matsubara Y, Narisawa K: Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 1999;135:375-378.
39. Lagler FB, Gersting SW, Zsifkovits C, Steinbacher A, Eichinger A, Danezka MK, Staudigl M, Fingerhut R, Glossmann H, Muntau AC: New insights into tetrahydrobiopterin pharmacodynamics from *Pah<sup>enu1/2</sup>*, a mouse model for compound heterozygous tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency: *Biochemical Pharmacology* 2010; 80:1563-1571.
40. Lee YY, Hong SH, Lee YJ, Chung SS, Jung HS, Park SG, Park KS: Tauroursodeoxycholate (TUDCA), chemical chaperone, enhances function of islets by reducing ER stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010; 397: 735-739.
41. Lee P, Treacy EP, Crombez E, Wasserstein M, Waber L, Wolff J, Wendel U, Dorenbaum A, Bechuk JD, Christ-Schmidt H, Seashore M, Giovannini M, Burton BK, Morris AA: Safety and efficacy of 22 weeks of treatment with sapropterin dihydrochloride for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: *Am J Med Genet* 2008; 146A:2851-2859.
42. Levy HL, Milanowski A, Chakrapani A, Cleary M, Lee P, Trefz FK, Whitley CB, Feillet F, Feigenbaum AS, Bechuk JD, Christ-Schmidt H, Dorenbaum A: Efficacy of sapropterin dihydrochloride for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria; A phase III randomised placebo-controlled study: *Lancet* 2007; 370:504-510.
43. Lombeck I, Kasperek K, Harbisch HD, Becker K, Schumann E, Schroter W, Feinendegen LE, Bremer HJ: The selenium state of children. II. Selenium content of serum, whole blood, hair and the activity of erythrocyte glutathione peroxidase in dietetically treated patients with phenylketonuria and maple-syrup-urine disease. *Eur J Pediatr* 1978;128:213-223.
44. MacDonald A: Diet and compliance in phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 2000; 159 Suppl 2:S136-S141.
45. MacDonald A, Harris G, Rylance G, Asplin D, Booth IW: Abnormal feeding behaviours in phenylketonuria. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 1997;10:163-170.
46. Maestri NE, Brusilow SW, Clissold DB, Bassett SS: Long-term treatment of girls with ornithine transcarbamylase deficiency. *N Engl J Med*. 1996;335:855-859.
47. Martins IJ, Vermeulen R, Redgrave TG: Relative roles of mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in the metabolism of chylomicron remnants in rats and mice as assessed by a stable-isotope breath test. *Atherosclerosis* 2000;150:13-20.

48. Matalon R, Koch R, Michals-Matalon K, Moseley K, Surendran S, Tying S, Erlandsen H, Gamez A, Stevens RC, Romstad A, Moller LB, Guttler F: Biopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med* 2004;6:27-32.
49. McGuire BM, Scharschmidt BF, Zupanets IA, Lowe ME, Xiao X, Sypliy VA, Monteleone J, Gargosky S, Dickinson K, Martinez A, Mokhtarani M: Pharmacology and safety of glycerol phenylbutyrate in healthy adults and adults with cirrhosis. *Hepatology, Official Journal of the American Association for the study of liver diseases* 2010;51:2077-2085.
50. McDonald JD, Andriolo M, Cali F, Mirisola M, Puglisi-Allegra S, Romano V, Sarkissian CN, Smith CB: The phenylketonuria mouse model: a meeting review. *Mol Genet Metab* 2002;76:256-261.
51. Merck online, [assets.chemportals.merck.de/documents/sds/emd/deu/de/1072/107267.pdf](https://assets.chemportals.merck.de/documents/sds/emd/deu/de/1072/107267.pdf), Stand 31.07.2013.
52. Mitnaul LJ, Shiman R: Coordinate regulation of tetrahydrobiopterin turnover and phenylalanine hydroxylase activity in rat liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:885-889.
53. Mütze U, Arélin M, Beblo S: Klassische Phenylketonurie und Tetrahydrobiopterin (BH4)-responsive Hyperphenylalaninämie. *Kinder- und Jugendmedizin* 2011;5:243-250.
54. Muntau AC, Beblo S., Koletzko B.: Phenylketonurie und Hyperphenylalaninämie. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2000;179-193.
55. Muntau AC, Streiter M, Kappler M, Roschinger W, Schmid I, Rehnert A, Schramel P, Roscher AA: Age-related reference values for serum selenium concentrations in infants and children. *Clin Chem* 2002b;48:555-560.
56. Muntau AC, Roschinger W, Habich M, Demmelmair H, Hoffmann B, Sommerhoff CP, Roscher AA: Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med* 2002a;347:2122-2132.
57. Muntau A C, Gersting S W: Phenylketonuria as a model for protein misfolding diseases and for the development of next generation orphan drugs for patients with inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis* 2010; 33:649-659.
58. National PKU News, [www.pkunews.org/research/Spring2008\\_pages1-3.pdf](http://www.pkunews.org/research/Spring2008_pages1-3.pdf), Stand 31.07.2013.
59. Okano Y, Hase Y, Kawajiri M, Nishi Y, Inui K, Sakai N, Tanaka Y, Takatori K, Kajiwar M, Yamano T: *In Vivo* Studies of Phenylalanine Hydroxylase by Phenylalanine Breath Test: Diagnosis of Tetrahydrobiopterin-Responsive Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. *Pediatr Res* 2004.

60. Okano Y, Takatori K, Kudo S, Sakaguchi T, Asada M, Kajiwara M, Yamano T: Effect of tetrahydrobiopterin and phenylalanine on *in vivo* human phenylalanine hydroxylase by phenylalanine breath test. *Molecular Genetics and Metabolism* 2007; 92 (4):308-314.
61. Özcan U, Yilmaz E, Özcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Görgün CZ, Hotamisligil GS: Chemical Chaperons Reduce ER Stress and Restore Glucose Homeostasis in a Mouse Model of Type 2 Diabetes. *Science Magazine* 2006; 313 (5790): 1137-1140.
62. Perez-Duenas B, Vilaseca MA, Mas A, Lambruschini N, Artuch R, Gomez L, Pineda J, Gutierrez A, Mila M, Campistol J: Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria. *Clin Biochem* 2004;37:1083-1090.
63. Pey AL, Martinez A: The activity of wild-type and mutant phenylalanine hydroxylase and its regulation by phenylalanine and tetrahydrobiopterin at physiological and pathological concentrations: An isothermal titration calorimetry study. *Mol Genet Metab* 2005;86:43-53.
64. Pey AL, Pérez B, Desviat LR, Martínez MA, Aguado C, Erlandsen H, et al. Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. *Hum Mutat* 2004; 24:388–99.
65. Pubchem Compound, National Center for Biotechnology Information (NCBI), [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), Stand 22.03.2009
66. Realmuto GM, Garfinkel BD, Tuchman M, Tsai MY, Chang PN, Fisch RO, Shapiro S: Psychiatric diagnosis and behavioral characteristics of phenylketonuric children. *J Nerv Ment Dis* 1986;174:536-540.
67. Reilly C, Barrett JE, Patterson CM, Tinggi U, Latham SL, Marrinan A: Trace element nutrition status and dietary intake of children with phenylketonuria. *Am J Clin Nutr* 1990;52:159-165.
68. Sanjurjo P, Perteagudo L, Rodriguez SJ, Vilaseca A, Campistol J: Polyunsaturated fatty acid status in patients with phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 1994;17:704-709.
69. Sarkissian CN, Boulais DM, McDonald JD, Scriver CR: A heteroallelic mutant mouse model: A new orthologue for human hyperphenylalaninemia. *Mol Genet Metab* 2000;69:188-194.
70. Schwedt, Georg: Taschenatlas der Analytik; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1996.
71. Scriver CR, Waters PJ, Sarkissian C, Ryan S, Prevost L, Cote D, Novak J, Teebi S, Nowacki PM: PAHdb: a locus-specific knowledgebase. *Hum Mutat* 2000;15:99-104.
72. Shiman R, Gray DW, Hill MA. Regulation of rat liver phenylalanine hydroxylase. I. Kinetic properties of the enzymes iron and enzyme reduction site. *J Biol Chem* 1994; 269:24637–46.

73. Shiman R, Xia T, Hill MA, Gray DW. Regulation of rat liver phenylalanine hydroxylase. II. Substrate binding and the role of activation in the control of enzymatic activity. *J Biol Chem* 1994; 269:24647–56.
74. Shintaku H, Fujioka H, Sawada Y, Asada M, Yamano T: Plasma biopterin levels and tetrahydrobiopterin responsiveness. *Mol Genet Metab* 2005;86:104-106.
75. Shintaku H, Kure S, Ohura T, Okano Y, Ohwada M, Sugiyama N, Sakura N, Yoshida I, Yoshino M, Matsubara Y, Suzuki K, Aoki K, Kitagawa T: Long-term treatment and diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia with a mutant phenylalanine hydroxylase gene. *Pediatr Res* 2004;55:425-430.
76. Smith I, Hyland K, Kendall B: Clinical role of pteridine therapy in tetrahydrobiopterin deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1985;8 Suppl 1:39-45.
77. Spaapen LJ, Rubio-Gozalbo ME: Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, state of the art. *Mol Genet Metab* 2003;78:93-99.
78. The Stevens Laboratory, [stevens.scripps.edu/PKU\\_BasicResearch.html](http://stevens.scripps.edu/PKU_BasicResearch.html), Stand 06.08.2013
79. Symonds E, Butler R, Omari T: Noninvasive breath tests can detect alterations in gastric emptying in the mouse. *Eur J Clin Invest* 2002;32:341-344.
80. Symonds EL, Butler RN, Omari TI: Assessment of gastric emptying in the mouse using the [<sup>13</sup>C]-octanoic acid breath test. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27:671-675.
81. Thöny B, Ding Z, Martinez A: Tetrahydrobiopterin protects phenylalanine hydroxylase activity *in vivo*: implications for tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia. *FEBS Lett* 2004;577:507-511.
82. Treacy EP, Delente JJ, Elkas G, Carter K, Lambert M, Waters PJ, Scriver CR: Analysis of phenylalanine hydroxylase genotypes and hyperphenylalaninemia phenotypes using L-[1-<sup>13</sup>C]phenylalanine oxidation rates *in vivo*: a pilot study. *Pediatr Res* 1997;42:430-435.
83. Trefz FK, Scheible D, Frauendienst-Egger G, Korall H, Blau N: Long-term treatment of patients with mild and classical phenylketonuria by tetrahydrobiopterin. *Mol Genet Metab* 2005; 86S:75-80.
84. Trefz FK, Burton BK, Longo N, Casanova MM, Gruskin DJ, Dorenbaum A, Kakkis ED, Crombez EA, Grange DK, Harmatz P, Lipson MH, Milanowski A, Randolph LM, Vockley J, Whitley CB, Wolff JA, Bechuk J, Christ-Schmidt H, Hennermann JB: Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria; a phase III randomized double-blind placebo-controlled study. *J Pediatr* 2009; 154:700-707.
85. Weglage J, Funders B, Ullrich K, Rupp A, Schmidt E: Psychosocial aspects in phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1996;155 Suppl 1:S101-S104.

86. Weglage J, Funders B, Wilken B, Schubert D, Schmidt E, Burgard P, Ullrich K: Psychological and social findings in adolescents with phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1992;151:522-525.
87. Xia T, Gray DW, Shiman R. Regulation of rat liver phenylalanine hydroxylase. III. Control of catalysis by (6R)-tetrahydrobiopterin and phenylalanine. *J Biol Chem* 1994; 269:24657–65.
88. Yam GH-F, Gaplovska-Kysela K, Zuber C, Roth J: Sodium 4-Phenylbutyrate Acts as a Chemical Chaperone on Misfolded Myocilin to Rescue Cells from Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2007; 48:1683-1690
89. Zsifkovits CJ: Mausmodell für die humane Tetrahydrobiopterin-sensitive Phenylketonurie. Dissertation Medizinische Universität Innsbruck 2007.
90. Zurflüh MR, Giovannini M, Fiori L, Fiege B, Gokdemir Y, Baykal T, et al. Screening for tetrahydrobiopterin deficiencies using dried blood spots on filter paper. *Mol Genet Metab* 2005; 86(Suppl 1):96–103.
91. Zurflüh MR, Zschocke J, Lindner M, Feillet F, Chery C, Burlina A, et al. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* 2008; 29:167–75.

## Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Alice Fuchs, geb. Steinbacher

geb. am 11.09.79 in Linz, Österreich

*Staatsangehörigkeit*      Österreich

*Familienstand*              verheiratet

### **Ausbildung**

<i>Aug 07 – heute</i>	<b>Doktorarbeit</b> „Tierexperimentelle Untersuchungen zu den pharmakodynamischen Effekten von Tetrahydrobiopterin und Natrium-Phenylbutyrat auf die <i>in vivo</i> Phenylalaninoxidationsrate von Mäusen mit genetisch bedingtem Defekt der Phenylalaninhydroxylase Betreuerin Prof. Dr. med. Ania C. Muntau
<i>Aug 07 – Feb 08</i>	Experimenteller Teil der Doktorarbeit am Institut für Biochemische Pharmakologie der Universität Innsbruck
<i>Okt 02 – Nov 09</i>	Studium der Humanmedizin an der LMU München mit <b>Abschlussnote Gut</b>
<i>Sep 00 – Jul 02</i>	Berufsoberschule Fachrichtung Sozial mit Abschluss Allgemeine Hochschulreife
<i>Apr 97 – Jul 99</i>	Ausbildung zur Arzthelferin in Praxis für Kinder- und Jugendheilkunde Dres. Platiel/Heydenreich, München
<i>1992 – 96</i>	Realschule Neubiberg, Abschluss Mittlere Reife
<i>1986 – 92</i>	Grund/Hauptschule Neubiberg

**Praktisches Jahr**

<i>Okt 08 – Jan 09</i>	Chirurgie, Victoria Hospital, Kapstadt, Südafrika
<i>Jun 08 – Okt 08</i>	Innere Medizin, Kantonspital Aarau, Schweiz
<i>Feb 08 – Jun 08</i>	Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinikum Großhadern, München

**Famulaturen**

<i>Aug 07</i>	Anästhesie, Iatros Klinik, München
<i>Mär 07</i>	Notfallmedizin, Royal Brisbane and Women Hospital, University of Queensland, Australien
<i>Mär 06</i>	Kinder- und Jugendheilkunde, Praxis Dr. Eckert, Wien, Österreich
<i>Aug 05</i>	Gynäkologie und Geburtshilfe, Geisenhofer Klinik, München

**Berufstätigkeit**

<i>Mär 10 – heute</i>	Assistenzärztin der Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinikum Traunstein
<i>Apr 09 – Juli 09</i>	studentische Hilfskraft der neurologischen Funktionsdiagnostik, Neurologischen Krankenhauses München-Schwabing
<i>Apr 06 – Jun 07</i>	studentische Hilfskraft der Tauchmedizin, Hyperbares Sauerstoffzentrum München
<i>Okt 99 – Apr 00</i>	Tätigkeit als Arzthelferin in internistisch/allgemeinärztlicher Gemeinschaftspraxis Dres. Plüger/Müller/Dornaus, Ottobrunn

## **Danksagung**

Frau Prof. Dr. Ania C. Muntau danke ich für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas und die unermüdliche Unterstützung beim Fertigstellen der schriftlichen Arbeit. Ihre klaren und detaillierten Kommentare haben sehr zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Florian Lagler für die immer ausgesprochen freundschaftliche Atmosphäre, die lehrreichen Diskussionen und die produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit. Nur durch den großen Einsatz von Herrn Lagler konnte diese Arbeit gelingen.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Biochemische Pharmakologie der Medizinischen Universität Innsbruck möchte ich grossen Dank aussprechen. Allen voran Maria Trieb, die u.a. durch die professionelle Durchführung der HPLC einen erheblichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat. Ihre ungezwungene und lustige Art hat viel zum positiven Arbeitsklima beigetragen. Ich wurde von allen Mitarbeitern des Instituts herzlichst aufgenommen und deshalb wird mir die gemeinsame Zeit in Innsbruck stets in guter Erinnerung bleiben.

Ohne die uneingeschränkte Unterstützung meines Mannes Matthias, der mir durch seine mathematischen Kenntnisse eine erhebliche Hilfe war und immer am Gelingen dieser Arbeit interessiert war, wären unzählige Stunden viel schwerer gewesen. Ihm möchte ich hiermit danken.

Der grösste Dank gebührt meinen Eltern. Ohne Ihre Unterstützung, Kraft und ihre Liebe, die mich all die Jahre durch mein Studium begleitet haben, wäre ich nicht in der Position in der ich jetzt glücklicherweise bin.



## Eidesstattliche Versicherung

ALICE FUCHS

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Tierexperimentelle Untersuchungen zu den pharmakodynamischen Effekten von  
Tetrahydrobiopterin und Natrium-Phenylbutyrat auf die *in vivo* Phenylalaninoxidationsrate  
von Mäusen mit genetisch bedingtem Defekt der Phenylalaninhydroxylase

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und  
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche  
kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln  
nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in  
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades  
eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin